

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INTERACTION DE LA MT1-MMP AVEC  
LA PROTÉINE ADAPTATRICE p130CAS  
AU COURS DE LA MIGRATION CELLULAIRE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE  
(CONCENTRATION BIOCHIMIE)

PAR  
MARISOL MICHAUD

MAI 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le docteur Richard Béliveau, qui m'a permis de vivre une expérience unique au sein de son laboratoire, ainsi que mon superviseur, le docteur Denis Gingras, qui m'a appris énormément par son expérience et son savoir inouï. Je tiens à remercier les docteurs Édith Beaulieu, Sylvie Lamy et Dominique Boivin pour leurs nombreux conseils et leur soutien. Je remercie spécialement Carine Nyalendo pour son aide, sa patience et beaucoup de bons moments passés ensemble. Je remercie Mathieu Provençal, David Labbé, Jessica Jackson, Xavier Vanier-Verville et tous ceux que j'ai côtoyés durant ces deux années pour leur amitié et leur sens de l'humour. Je remercie plus particulièrement Valérie Bédard sans qui cette aventure aurait été tout autre et finalement je remercie Richard Lefebvre qui a su m'encourager, me soutenir et me supporter tout au long de mes études. J'aimerais aussi remercier l'UQAM et le Centre de thérapies expérimentales du cancer de Montréal (CTECM) pour leur soutien financier.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES.....	xi
RÉSUMÉ.....	xii

### CHAPITRE I

INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Le développement du cancer.....	2
1.2 L'angiogenèse tumorale.....	3
1.3 L'angiogenèse et l'hémostase.....	5
1.3.1 La sphingosine-1-phosphate (S1P).....	6
1.3.1.1 Formation des replis membranaires et des complexes d'adhésion focale induite par la S1P.....	8
1.4 Implication de p130Cas dans la migration cellulaire.....	10
1.4.1 L'importance de la phosphorylation de p130Cas.....	11
1.4.2 La localisation de p130Cas.....	13
1.5 Dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases matricielles ..	14
1.5.1 Les métalloprotéases matricielles (MMPs).....	14
1.5.2 Les métalloprotéases matricielles de type membranaire (MT-MMPs) .....	16
1.5.3 La métalloprotéase matricielle de type membranaire-1 (MT1-MMP) .....	16
1.5.3.1 L'expression de la MT1-MMP dans les tumeurs.....	17
1.5.3.2 La régulation de la MT1-MMP .....	17
1.5.3.3 La localisation de la MT1-MMP .....	20
1.5.3.4 Les substrats de la MT1-MMP .....	20
1.6 Objectifs de l'étude .....	22

## CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	32
2.1 Matériel.....	32
2.1.1 Général.....	32
2.1.2 Les anticorps .....	33
2.2 Méthodes.....	33
2.2.1 Culture cellulaire .....	33
2.2.2 Immunoprécipitation et immunodétection.....	34
2.2.2.1 Stimulation des cellules.....	34
2.2.2.2 Inhibition de l'expression du gène de la MT1-MMP à l'aide d'un petit ARN interférent (siRNA) .....	34
2.2.2.3 Préparation des lysats cellulaires .....	35
2.2.2.4 Dosage des protéines .....	35
2.2.2.5 Immunoprécipitation.....	35
2.2.2.6 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western.....	36
2.2.2.7 Immunodétection des protéines .....	37
2.2.3 Immunofluorescence et microscopie confocale.....	37

## CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	39
3.1 La S1P induit la localisation de p130Cas et de Crk aux replis membranaires dans les cellules endothéliales .....	39
3.2 La S1P induit le transfert de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire .....	41
3.3 La S1P induit l'interaction des protéines MT1-MMP et p130Cas.....	42
3.4 La phosphorylation des tyrosines de p130Cas est importante pour la formation du complexe p130Cas/MT1-MMP .....	43
3.5 La MT1-MMP phosphorylée interagit avec p130Cas.....	45

## CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	58
4.1 L'implication du complexe MT1-MMP/p130Cas dans la migration cellulaire.....	58
4.2 Localisation de la MT1-MMP dans les replis membranaires .....	60
4.3 Importance de la tyrosine située dans la portion cytoplasmique de la MT1-MMP.....	61

## CHAPITRE V

CONCLUSION.....	63
-----------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	64
--------------------	----

## LISTE DES FIGURES

### Figures

1.1	Les facteurs de risques du cancer.....	23
1.2	Les six altérations essentielles de la physiologie cellulaire provoquant la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse.....	24
1.3	L'angiogenèse tumorale.....	25
1.4	Le développement d'un réseau de capillaires alimentant une tumeur.....	26
1.5	Les caractéristiques structurales de la protéine p130Cas.....	27
1.6	Les voies de signalisation impliquant p130Cas.....	28
1.7	Les domaines variables des MMPs.....	29
1.8	Les séquences insérées dans les MT-MMPs.....	30
1.9	La localisation de la MT1-MMP dans la migration cellulaire.....	31
3.1	Interaction entre p130Cas et Crk dans les HUVECs.....	47
3.2	La S1P induit la relocalisation de p130Cas et Crk à la périphérie cellulaire.....	48
3.3	La S1P induit la relocalisation de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire.....	49
3.4	La MT1-MMP n'est pas associée aux complexes d'adhésion focale.....	50

3.5	La S1P induit la colocalisation de la MT1-MMP et p130Cas à la périphérie cellulaire des HUVECs.....	51
3.6	La S1P induit l'interaction de la MT1-MMP et de p130Cas dans les HUVECs.....	52
3.7	Le siRNA de la MT1-MMP inhibe l'interaction entre la MT1-MMP et p130Cas dans les HUVECs.....	53
3.8	La toxine pertussique inhibe la phosphorylation de p130Cas et son association avec la MT1-MMP.....	54
3.9	PP2 inhibe la phosphorylation de p130Cas et son association avec la MT1-MMP.....	55
3.10	La S1P induit la phosphorylation des protéines MT1-MMP et p130Cas dans les HUVECs.....	56
3.11	La S1P induit la colocalisation de la MT1-MMP et p130Cas sous forme phosphorylée à la périphérie cellulaire.....	57



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

APS	persulfate d'ammonium
BCA	acide bicinchonique
BSA	albumine sérique bovine
CAS-L	<i>Crk-associated substrate in lymphocyte</i>
CE	cellule endothéliale
EDG	<i>endothelial differentiation gene (récepteur de S1P)</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
Efs/Sin	<i>embryonal fyn substrate/ Src interacting</i>
EGF	facteur de croissance épidermique
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique
EGTA	acide éthylèneglycol-bis-(-aminoéthyléther) tétraacétique
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	sérum foetal bovin
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HEF1	<i>human enhancer of filamentation</i>
HEX	domaine hémopexine

HUVEC	cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
IL	interleukine
LPA	acide lysophosphatidique
MEC	matrice extracellulaire
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MMP	métalloprotéase de la matrice extracellulaire
MT-CBP	<i>MT1-MMP cytoplasmic-binding protein</i>
MT-MMP	métalloprotéase de la matrice extracellulaire de type membranaire
p130Cas	substrat associé à Crk de 130 kDa
PAX	paxilline
PBS	tampon biphosphate salin
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PTX	toxine pertussique
PVDF	difluorure de polyvinylidène
RECK	<i>reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs</i>
S1P	sphingosine-1-phosphate
SBD	domaine liant Src
SD	domaine substrat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	petit ARN interférent
TBS	tampon tris-salin

TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tétraméthylènediamine
TGF	facteur de croissance transformant
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i>
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## LISTE DES SYMBOLES

%	pourcentage
°C	Degré Celcius
$\alpha$	alpha
$\beta$	bêta
$\gamma$	gamma
kDa	kilo Daltons
m <sup>2</sup>	mètre au carré
M	molaire
mM	millimolaire
mL	millilitre
min	minute
nm	nanomètre
µg	microgramme
µm	micromètre
µM	micromolaire
µL	microlitre
(p/v)	(poids/volume)
(v/v)	(volume/volume)

## RÉSUMÉ

L'angiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants, est un processus essentiel au développement et à la croissance des tumeurs. Bon nombre de protéines ont été étudiées afin d'élucider les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, dont la métalloprotéase membranaire de type 1 (MT1-MMP). Cette protéine est reconnue pour jouer un rôle crucial dans la migration cellulaire, détruisant la matrice extracellulaire pour permettre aux cellules de migrer et ce, dans différents types cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans le contrôle de son activité demeurent incompris. Dans la présente étude, nous avons observé, en utilisant des procédures d'immunoprécipitation et de microscopie confocale, que la stimulation des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVECs) avec la sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipide qui induit la migration des cellules endothéliales (CEs), provoque le transfert de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire et son association avec p130Cas (*Crk-associated substrate*). p130Cas est une protéine d'arrimage impliquée dans les voies de signalisation de la motilité cellulaire et est également reconnue pour se relocaliser dans des replis membranaires suite à une stimulation à la S1P. Ces résultats suggèrent fortement que l'identification du complexe MT1-MMP/p130Cas au front principal des CEs migrantes pourrait être un mécanisme efficace par lequel la protéolyse péricellulaire est reliée à l'activation des voies de signalisation, permettant la migration coordonnée des CEs au cours de l'angiogenèse.

Mots-clés : angiogenèse, MT1-MMP, p130Cas, migration, sphingosine 1-phosphate.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

Chaque année, 10 millions de personnes dans le monde développent un cancer et 7 millions de décès sont attribuables à cette maladie, ce qui correspond à 12 % de tous les décès enregistrés à l'échelle mondiale. En Amérique du Nord seulement, 10 millions de personnes vivent actuellement avec un cancer et 600 000 personnes mourront de la maladie au cours de l'année (Organisation mondiale de la santé, 2005). Actuellement, le rapport sur les *statistiques canadiennes sur le cancer 2007* révèle qu'au Canada, il y aura 159 900 nouveaux cas de cancer et 72 700 décès dus au cancer (Société canadienne du cancer, 2007), ce qui en fait la deuxième cause de mortalité au Canada, tout juste derrière les maladies cardiovasculaires.

L'analyse détaillée des facteurs responsables du cancer indique que le tabagisme ainsi qu'une alimentation déficiente sont responsables des deux tiers des cancers, loin devant les facteurs héréditaires (15 %). Par conséquent, le cancer est majoritairement causé par de mauvaises habitudes de vie (figure 1.1). La compréhension des mécanismes régissant le développement du cancer permettrait l'élaboration de nouvelles approches visant non seulement à traiter le cancer, mais également à prévenir son apparition.

### **1.1.1 Le développement du cancer**

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par six altérations essentielles de la physiologie cellulaire (figure 1.2) qui sont associées à la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. Premièrement, l'habileté des cellules cancéreuses à proliférer est non seulement déterminée par leur taux de prolifération cellulaire, mais également par leur taux de survie. La résistance à la mort cellulaire programmée (1), l'apoptose, représente la majeure source de leur survie et se fait par deux moyens, soit en réactivant des gènes de protéines anti-apoptotiques, soit en inactivant ceux codant pour des protéines pro-apoptotiques. Une cellule cancéreuse possède également une indépendance vis-à-vis les facteurs de croissance (2). En effet, une cellule saine requiert des signaux de croissance avant de pouvoir passer de son état quiescent à son état actif de prolifération. Ainsi, une cellule tumorale va générer ses propres facteurs de croissance, lui permettant de réduire sa dépendance envers le microenvironnement sain qui l'entoure. Par exemple, les glioblastomes et les sarcomes vont produire de façon respective leur propre PDGF (platelet-derived growth factor) et TGF $\alpha$  (tumor growth factor  $\alpha$ ) (Hanahan et Weinberg, 2000). Dans un tissu sain, de multiples signaux antiprolifératifs maintiennent la quiescence et l'homéostasie tissulaire. Les signaux inhibiteurs de la croissance peuvent bloquer la prolifération. Ainsi, les cellules cancéreuses doivent échapper à ces inhibiteurs si elles veulent survivre, elles deviennent donc insensibles aux signaux inhibiteurs de la croissance (3). Par exemple, certaines cellules cancéreuses vont inactiver le gène de la protéine du rétinoblastome, un inhibiteur majeur de la prolifération cellulaire.

Les trois habiletés précédentes permettent à la cellule cancéreuse de devenir indépendante des signaux provenant de son environnement. Cependant, des études ont montré que cela n'était pas suffisant afin d'obtenir une croissance tumorale soutenue. Alors qu'une cellule normale possède son propre programme de multiplication limitée, les cellules tumorales sont quant à elles immortelles, suggérant

un potentiel de réplication illimité (4) qui semble essentiel pour sa croissance à l'état malin. Tôt ou tard durant le développement de la plupart des types de cancer, la masse tumorale primaire engendre une cellule pionnière qui va quitter le site, envahir les tissus environnants et voyager vers des sites éloignés où elle pourra fonder une nouvelle colonie. Ces nouvelles colonies de cellules tumorales, les métastases (5), sont responsables de 90 % des décès causés par le cancer chez l'humain (Hanahan et Weinberg, 2000). Finalement, la dernière altération essentielle étudiée est l'angiogenèse soutenue (6). Il est maintenant bien connu que l'environnement des cellules cancéreuses génétiquement altérées joue un rôle primordial dans la croissance tumorale, entre autre en leur procurant une vascularisation permettant de nourrir la tumeur. En effet, une tumeur ne peut croître ou encore former des métastases sans le recrutement de ces nouveaux vaisseaux sanguins par l'angiogenèse, d'où l'importance de ce processus dans la progression du cancer. La compréhension des mécanismes responsables de l'angiogenèse et des relations entre les cellules cancéreuses et leur environnement en général pourrait donc permettre de développer de nouvelles stratégies anticancéreuses efficaces qui amélioreraient l'efficacité des traitements actuels (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) (Sanz et Alvarez-Vallina, 2003).

## **1.2 L'angiogenèse tumorale**

Les vaisseaux sanguins ont longtemps été considérés comme de simples compartiments de transport pour le sang. Aujourd'hui, la vasculature est reconnue comme l'un des principaux organes du corps, occupant une surface de plus de 900 m<sup>2</sup> et jouant un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité corporelle (Griffioen et Molema, 2000). L'angiogenèse est définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants (Folkman et Shing, 1992). Elle joue un rôle majeur dans divers processus physiologiques tels que l'embryogenèse, l'allaitement, la réponse immunitaire, la cicatrisation et lors du cycle



menstruel (Griffioen et Molema, 2000). L'angiogenèse peut cependant participer au développement de diverses pathologies impliquant une inflammation et une réparation tissulaire, telles que les rétinopathies diabétiques, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et le cancer (Griffioen et Molema, 2000; Sivakumar, Harry et Paleolog, 2004). Dans ce dernier cas, les observations réalisées par les Drs Folkman et Denekamp ont permis de démontrer que les tumeurs étaient hautement vascularisées et fortement dépendantes de cet apport sanguin pour leur croissance (Griffioen et Molema, 2000). En effet, malgré ses capacités hors du commun à survivre, la cellule cancéreuse a besoin d'oxygène et de nutriments de façon constante afin de croître. Dès qu'une tumeur atteint 1 à 2 mm<sup>3</sup>, les cellules cancéreuses manquent de nutriments et d'oxygène (hypoxie) et sécrètent de nombreuses cytokines telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (CEs) (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Ces cytokines vont rejoindre les vaisseaux les plus proches et les CEs qui constituent ces vaisseaux vont réagir en dégradant la membrane basale (mince couche de la matrice extracellulaire qui limite les vaisseaux).

Normalement, les CEs ont un taux de prolifération très bas et la croissance des nouveaux vaisseaux se produit seulement lors de la reproduction ou de la cicatrisation. Cependant, lors d'un contact avec les signaux chimiques provenant de la tumeur, les CEs vont proliférer de 20 à 2000 fois plus vite que l'endothélium d'un vaisseau normal chez l'adulte (Denekamp, 1984). Pour ce faire, des métalloprotéases matricielles (MMPs) situées à la périphérie des CEs vont dégrader la membrane basale et remodeler la matrice extracellulaire (MEC), permettant aux cellules de se frayer un chemin et de migrer jusqu'à la tumeur. Par conséquent, la tumeur retrouve l'énergie et l'oxygène nécessaire à sa croissance et à son expansion dans les tissus avoisinants (Figure 1.3). Le développement tumoral marqué par la formation de capillaires est appelé « switch angiogénique », permettant la croissance de la tumeur par la disponibilité de nutriments et d'oxygène.

Le développement de ce réseau de capillaires (Figure 1.4) favorise l'interaction de la tumeur avec les tissus avoisinants, augmentant du même coup le risque de métastases par les cellules cancéreuses qui s'échappent dans la circulation sanguine périphérique (Engelse *et al.*, 2004). Ainsi, le remodelage de la MEC environnant les vaisseaux sanguins par les MMPs représente un processus essentiel qui sous-tend la migration cellulaire et l'angiogenèse (Pepper, 2001).

### 1.3 L'angiogenèse et l'hémostase

En plus de son action sur la prolifération et la migration des CEs, le VEGF provoque une hausse importante de la perméabilité de ces cellules (Griffioen et Molema, 2000). Cette hausse de perméabilité entraîne le transfert du fibrinogène sanguin vers le stroma de la tumeur, menant à la formation d'une matrice de fibrine par l'activité pro-coagulante associée aux cellules tumorales (Pirie-Shepherd, 2003). Une telle relation entre le cancer et l'hémostase a été établie pour la première fois par Armand Trousseau en 1865, lorsqu'il remarqua une grande incidence de thromboembolies veineuses chez plusieurs patients atteints de carcinomes gastro-intestinaux (Boccaccio et Comoglio, 2005). Depuis, il a été démontré que la majorité des types de cancers sont associés à une activation de la coagulation (Lee, 2002). Les désordres de coagulation chez les patients atteints du cancer sont généralement marqués par une augmentation des concentrations de fibrine ou de produits de dégradation du fibrinogène mesurés dans le sang (Nash, Walsh et Kakkar, 2001). Ces patients présentent également un nombre plus élevé de plaquettes sanguines. Ainsi, l'activation de la coagulation induite par la tumeur et la formation de fibrine sont intrinsèquement impliquées dans l'angiogenèse, la croissance tumorale et la formation de métastases (Lee, 2002).

La matrice de fibrine présente dans l'environnement de la tumeur constitue également un substrat idéal pour la liaison et l'activation des plaquettes sanguines. Une fois activées, les plaquettes relarguent des facteurs de coagulation ainsi que des facteurs anti- et proangiogéniques. Elles produisent un des plus larges éventails de facteurs angiogéniques, incluant le VEGF, PDGF, TGF, EGF, bFGF et IL-6 et leur libération stimule les CEs et soutient l'angiogenèse (Nash, Walsh et Kakkar, 2001; Pinedo *et al.*, 1998). En conséquence, les plaquettes contribuent au maintien de l'intégrité de la membrane vasculaire endothéliale requise pour l'angiogenèse et l'hémostase vasculaire (Gainor *et al.*, 2000) ainsi qu'à la stimulation de la prolifération des CEs (Verheul *et al.*, 1997). De plus, l'activation des plaquettes durant la coagulation amène la libération de lipides bioactifs tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P) et l'acide lysophosphatidique (LPA) (English *et al.*, 2002; Spiegel et Milstien, 2003). Les plaquettes représentent la source principale de la S1P dans le plasma et le sérum (Yatomi *et al.*, 1997).

### **1.3.1 La sphingosine-1-phosphate (S1P)**

La S1P et le LPA sont des lipides bioactifs qui exercent divers effets biologiques. Ils possèdent plusieurs fonctions communes dont l'induction de la formation de fibres de stress, la formation de complexes d'adhésions focales, la prolifération cellulaire et l'agrégation plaquettaire (Panetti, 2002). Ces lipides ont également des actions distinctes puisque la S1P induit l'angiogenèse alors que le LPA ne le fait pas. En effet, depuis la découverte du rôle majeur que joue la S1P dans la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 1991), il a été démontré qu'elle était impliquée dans plusieurs processus biologiques, dont la différenciation, la survie et la migration cellulaire, la réorganisation du cytosquelette ainsi que l'angiogenèse (Goetzl et An, 1998; Hla *et al.*, 1999; Moolenaar, 1999; Payne, Milstien et Spiegel, 2002; Spiegel, 1999).

Il est maintenant clairement établi que la S1P exerce ses effets comme médiateur intracellulaire et extracellulaire (Hla *et al.*, 1999). D'une part, elle agit au niveau intracellulaire et régule des voies de signalisation qui stimulent la croissance et la survie cellulaire et, d'autre part, elle peut être sécrétée et agir par la liaison à ses récepteurs spécifiques et ainsi induire diverses voies de signalisation menant entre autres à l'augmentation de la migration cellulaire et de l'angiogenèse (Spiegel, English et Milstien, 2002). Cinq membres de la famille des récepteurs de la S1P ont été identifiés (S1P<sub>1-5</sub> ou EDG<sub>1-8</sub>) (Kluk et Hla, 2002) mais la liaison de la S1P aux récepteurs S1P<sub>1</sub> et S1P<sub>3</sub> semble la plus importante pour l'effet de ce lipide sur la prolifération et la migration des CEs ainsi que sur la formation de structures tubulaires *in vitro* (Lee *et al.*, 1999a; Lee *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Paik *et al.*, 2001).

Dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVECs), le récepteur de la S1P, S1P<sub>1</sub> est abondamment exprimé (Lee *et al.*, 1999a) et la liaison de la S1P à ce récepteur stimule la prolifération de ces cellules (Lee *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999). L'activation de Src et de Rac par la S1P mènerait à la polymérisation de l'actine conduisant à la formation de lamellipodes et à la migration cellulaire (Vouret-Craviari *et al.*, 2002). La prolifération induite par la S1P dans les CEs est sensible à la toxine pertussique (PTX) qui inactive les protéines G<sub>i</sub> et G<sub>o</sub> (Ohmori *et al.*, 2001), suggérant effectivement un rôle des récepteurs S1P dans ce processus (Kimura *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999).

La S1P modifie également la forme de la cellule en augmentant la formation de fibres de stress, ce qui pourrait mener à des renforcements de l'adhérence cellule-matrice ainsi qu'à des changements au niveau de la perméabilité de la barrière des CEs (Lee *et al.*, 1999a; McVerry et Garcia, 2004; Panetti, 2002). Des études ont rapporté que la diminution de la perméabilité des CEs due à la S1P est dépendante de l'activation de Rho, de Rac et de G<sub>i</sub>, via une activation des récepteurs S1P<sub>1</sub> et

S1P<sub>3</sub> (Garcia *et al.*, 2001; McVerry et Garcia, 2005). Ces données suggèrent donc un rôle de la S1P dans la stabilisation des nouveaux vaisseaux, rôle supporté par l'observation que des souris n'exprimant pas de S1P meurent *in utero* des suites d'une incapacité à former des vaisseaux sanguins stables (Liu *et al.*, 2000). Ainsi, l'élucidation des voies de signalisation médiées par les récepteurs S1P dans les CEs vasculaires pourrait mener à une meilleure compréhension des événements vasculaires impliqués dans la relation existant entre le système hémostatique et l'angiogenèse (Ohmori *et al.*, 2001). De plus, les effets de la S1P sur les fonctions des cellules endothéliales vasculaires sont importants puisque l'interaction des plaquettes et des CEs peut être impliquée dans diverses activités telles que la thrombose, l'hémostase, l'angiogenèse et l'artériosclérose.

#### *1.3.1.1 Formation des replis membranaires et des complexes d'adhésion focale induite par la S1P*

La réorganisation du cytosquelette par la S1P implique le réarrangement de l'actine (Garcia *et al.*, 2001), l'assemblage des complexes d'adhésion focale et la formation de fibres de stress (Ohmori *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997). En plus de ces changements au niveau du cytosquelette, on a démontré que les replis membranaires (*membrane ruffles*) étaient une caractéristique des cellules en migration (Lauffenburger et Horwitz, 1996).

Les complexes d'adhésions focales sont des sites d'ancrage transmembranaire où la MEC est indirectement reliée au cytosquelette d'actine via un réseau de protéines d'ancrage. Ces complexes jouent un rôle important dans la régulation de l'organisation de l'actine, ce qui affecte l'étalement, la morphogenèse ainsi que la migration cellulaire. Les complexes d'adhésion sont des structures dynamiques et hétérogènes qui varient en taille et en organisation (Parsons *et al.*, 2000). En effet, on a rapporté que plus de 50 protéines étaient associées aux contacts focaux et

reliées à l'adhésion à la MEC dont des intégrines, des protéoglycans, des récepteurs à glycosaminoglycans ainsi que des molécules de signalisation (Zamir et Geiger, 2001). La plupart de ces protéines possèdent de multiples domaines par lesquels elles interagissent avec divers partenaires moléculaires, ce qui crée un réseau protéique hétérogène très dense à la surface cytoplasmique des sites d'adhésion.

Il a été montré que les contacts focaux doivent être régulés afin de générer une force de traction à l'avant de la cellule migrante et initier un mouvement directionnel. Pour ce faire, les kinases et les molécules adaptatrices dont la kinase d'adhésion focale (FAK), Src, p130Cas, paxilline, ERK et MLCK (*myosin light-chain kinase*) sont critiques pour le renouvellement des complexes d'adhésion focale à l'avant des cellules (Hauck *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2004). De récentes études ont rapporté que FAK pourrait être activée soit par la MEC ou par des facteurs de croissance et que la phosphorylation de ses tyrosines serait associée avec la formation des contacts focaux (Parsons, 2003). Parmi les molécules qui interagissent avec FAK, les mieux caractérisées sont p130Cas et la paxilline (Chodniewicz et Klemke, 2004; Hanks *et al.*, 2003; Turner, 2000).

La formation de replis membranaires suite à la stimulation par la S1P semble tout aussi complexe, mais a été moins étudiée jusqu'à aujourd'hui. Néanmoins, des études ont montré que la S1P induit la phosphorylation de la protéine adaptatrice Crk, suivie de l'activation de la famille des tyrosines kinases Src et que cette protéine serait responsable de la formation des replis membranaires ainsi que de la migration cellulaire induite par la S1P dans les HUVECs (Endo *et al.*, 2002). Cependant, le mécanisme exact de la formation de ces structures demeure largement incompris (Yoon *et al.*, 2003). Ainsi, des données suggèrent que lors de la stimulation des HUVECs avec la S1P : 1) les événements impliquant le cytosquelette peuvent être séparés en deux voies, une médiée par la protéine  $G_i$  (impliquant p130Cas) et une autre médiée par la protéine Rho (impliquant FAK) et 2)

la coordination de ces deux voies est requise pour la stimulation de la motilité des HUVECs par la S1P (Liu *et al.*, 2001; Ohmori *et al.*, 2001; Paik *et al.*, 2001; Panetti, Nowlen et Mosher, 2000).

#### 1.4 Implication de p130Cas dans la migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus coordonné qui implique des changements rapides de la dynamique des filaments d'actine, avec la formation et le désassemblage des sites d'adhésions cellulaires (Mitra, Hanson et Schlaepfer, 2005). En effet, elle requiert une réorganisation continue du cytosquelette d'actine à l'intérieur des cellules tout en concertant l'action de plusieurs récepteurs de la MEC et d'enzymes dégradant la MEC incluant les membres de la famille des MMPs (Lauffenburger et Horwitz, 1996; Mitchison et Cramer, 1996; Ellis et Murphy, 2001).

La famille des Cas comprend trois protéines soit HEF-1 (*human enhancer of filamentation*) aussi connue sous le nom de Cas-L (*Crk-associated substrate in lymphocyte*), Efs/Sin (*embryonal fyn substrate/Src interacting*) et p130Cas (*Crk-associated substrate*). Ces protéines possèdent une très grande similitude structurale (Defilippi, Di Stefano et Cabodi, 2006) mais leur expression, leur distribution tissulaire ainsi que leur rôle fonctionnel sont distincts. En effet, p130Cas est exprimée de façon ubiquitaire et la délétion de son gène dans des souris est létale au stade embryonnaire (Honda *et al.*, 1998), suggérant que ses fonctions dans le développement ne sont pas compensées par les deux autres membres de la famille Cas. La protéine p130Cas a été identifiée pour la première fois comme une protéine de 130 kDa phosphorylée sur ses résidus tyrosines dans les cellules transformées par v-Src ou v-Crk (Sakai *et al.*, 1994). p130Cas est considérée comme un substrat de Src, trouvée dans des sites d'adhésion cellulaire reliés aux intégrines et liés à la motilité et à la survie cellulaire (Brabek *et al.*, 2004). Bien que

p130Cas ne possède pas d'activité catalytique, son clonage a révélé une structure compatible avec un rôle d'arrimage, avec de multiples domaines d'interactions protéine-protéine (Figure 1.5), incluant un domaine SH3 N-terminal, un domaine liant Src (SBD) près du C-terminal et un domaine substrat interne (SD) (Sakai *et al.*, 1994). Le SD est caractérisé par 15 motifs Tyr-X-X-Pro (YxxP) qui inclut le site majeur où p130Cas subit la phosphorylation de ces tyrosines (Fonseca *et al.*, 2004; Nakamoto *et al.*, 1996).

#### **1.4.1 L'importance de la phosphorylation de p130Cas**

p130Cas peut être phosphorylée par diverses voies, incluant celles activées par les intégrines et par les récepteurs couplés à la protéine  $G_i$  (Casamassima et Rozengurt, 1997; Nakamoto *et al.*, 1997; Sayeski *et al.*, 1998), mais sa phosphorylation résulte essentiellement de l'action de la famille des kinases Src (Klinghoffer *et al.*, 1999; Ruest *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1997; Vuori *et al.*, 1996). Un mécanisme indirect de phosphorylation impliquant FAK a également été proposé, mais son rôle demeure à être défini (Ruest *et al.*, 2001; Vuori *et al.*, 1996). Par conséquent, l'implication de p130Cas dans la migration cellulaire dépend principalement de la phosphorylation de ces résidus tyrosines par Src et de la formation du complexe p130Cas-Crk, avec la protéine DOCK180 aux sites d'adhésion (Gustavsson, Yuan et Fallman, 2004; Webb *et al.*, 2004). DOCK180 est une protéine qui joue un rôle critique dans la régulation de la GTPase Rac, et ce, durant plusieurs processus biologiques importants tels que la phagocytose et la migration cellulaire (Cote et Vuori, 2002). Cependant, le mécanisme par lequel les tyrosines de p130Cas sont phosphorylées et comment cette protéine d'échafaudage est impliquée dans la réponse de la cellule à divers stimuli reste à être clarifié, notamment dans les CE vasculaires stimulées avec la S1P (Ohmori *et al.*, 2001). Dans ces cellules, il a été rapporté que la S1P stimule la phosphorylation de p130Cas et de FAK (Lee *et al.*, 2000b), ces deux événements pouvant contribuer à la migration induite par ce lipide (Panetti, 2002). Il a également été observé que



dans les HUVECs, Fyn, et non Src ou Lyn, était associé à p130Cas et que la phosphorylation des tyrosines de p130Cas était inhibée par des inhibiteurs spécifiques de la famille des kinases Src tels que PP2. Par contre, Src pourrait néanmoins jouer un rôle dans la phosphorylation de p130Cas (Ohmori *et al.*, 2001). Cette phosphorylation de p130Cas par les kinases de la famille Src dépend de l'activation de la protéine  $G_i$  puisqu'elles sont abolies par la toxine pertussique, un inhibiteur bien connu de cette protéine (Ohmori *et al.*, 2001). Cependant, l'activation de la protéine RhoA ne semble pas jouer de rôle dans ce processus, comme en témoigne l'absence d'effets inhibiteurs de l'exoenzyme C3 (inhibiteur de RhoA) ainsi que Y-27632, un inhibiteur de Rho kinase (Ohmori *et al.*, 2001).

La présence de plusieurs séquences conservées et de modifications post-traductionnelles chez p130Cas, dont la plupart sont des phosphorylations de tyrosines et de sérines, suggère que p130Cas est une protéine adaptatrice qui peut promouvoir les interactions protéine-protéine, menant à la formation de complexes multi protéiques (Figure 1.6) (Defilippi, Di Stefano et Cabodi, 2006). La cascade de signalisation provenant de la formation de ces complexes par p130Cas provoque l'augmentation de l'activité de la GTPase Rac, la stimulation de la formation des replis membranaires ou lamellipodes et la promotion de la migration et l'invasion cellulaire (Brabek *et al.*, 2004; Cho et Klemke, 2002; Hsia *et al.*, 2003). De plus, dans les carcinomes du sein, la surexpression de p130Cas régule de façon positive l'activité de Src (Cabodi *et al.*, 2004) et augmente la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines cellulaires endogènes (Brabek *et al.*, 2004; Burnham *et al.*, 2000; Cabodi *et al.*, 2004) menant à une prolifération accrue de ces cellules.

### **1.4.2 La localisation de p130Cas**

La localisation subcellulaire de p130Cas en réponse à divers stimuli cellulaires demeure encore mal définie. Les études ont démontré que la majorité de p130Cas est située dans le cytoplasme et qu'elle est transférée soit aux replis membranaires (Klemke *et al.*, 1998) ou dans les adhésions focales (Nakamoto *et al.*, 1997) durant l'attachement initial des cellules aux protéines matricielles. Dans certaines études, p130Cas a été rapportée comme étant une composante des adhésions focales contribuant à la réorganisation du cytosquelette par l'assemblage des filaments d'actine (Schlaepfer et Hunter, 1998). Par contre, bien que p130Cas soit localisée dans les adhésions focales, d'une façon dépendante de la voie de signalisation de Rho, dans plusieurs types cellulaires (Needham et Rozengurt, 1998; Rozengurt, 1998), elle est notamment concentrée dans les replis membranaires des CEs et jouerait un rôle important lors de la migration cellulaire (Cheresh, Leng et Klemke, 1999; Klemke *et al.*, 1998).

La phosphorylation de p130Cas semble jouer un rôle important dans sa localisation subcellulaire. Par exemple, la phosphorylation des tyrosines de la protéine p130Cas induite par la S1P provoque son interaction avec Crk et leur localisation aux replis membranaires, mais pas dans les adhésions focales (Ohmori *et al.*, 2001). Lors de la stimulation des HUVECs à l'aide de la S1P, Crk, par son domaine SH2, interagit avec les tyrosines phosphorylées de p130Cas et le complexe p130Cas-Crk est alors transféré à la périphérie cellulaire, par un processus impliquant la protéine G<sub>i</sub>, Fyn mais non Rho. Ainsi, p130Cas est accumulée dans les lamellipodes situés au front principal de migration. La formation du complexe p130Cas-Crk et l'activation subséquente de Rac sont nécessaires afin de créer les replis membranaires et ce, indépendamment des contractions d'actine-myosine (Cheresh, Leng et Klemke, 1999; Klemke *et al.*, 1998). Lors de la motilité et de la survie cellulaire, le recrutement de la protéine adaptatrice Crk aux sites du SD

phosphorylé de p130Cas semble être une étape cruciale dans la promotion des événements de la cascade de signalisation impliqués dans ces processus (Cho et Klemke, 2000; Klemke *et al.*, 1998). Par conséquent, le complexe Crk-p130Cas joue un rôle important dans la migration cellulaire médiée par les intégrines et ce, dans plusieurs systèmes cellulaires (Klemke *et al.*, 1998; Vuori *et al.*, 1996).

## **1.5 Dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases matricielles**

En plus des voies de signalisation induites par les facteurs de croissance, la MEC joue également un rôle prédominant dans le processus d'angiogenèse (Stupack et Cheresch, 2003). La MEC est indispensable afin de maintenir l'architecture des tissus, fournir un soutien cellulaire et procurer des signaux de survie ainsi que des facteurs de croissance. De ce fait, la MEC est essentielle au contrôle de l'environnement cellulaire local (Werb, 1997). Cependant, lors de la migration cellulaire, cette MEC doit être dégradée par les cellules en mouvement, cette dégradation étant extrêmement contrôlée et se faisant uniquement dans la direction de la migration. Parmi les enzymes responsables de cette dégradation de la MEC, les MMPs jouent un rôle déterminant dans le processus de migration cellulaire selon plusieurs études.

### **1.5.1 Les métalloprotéases matricielles (MMPs)**

Les MMPs influencent divers processus physiologiques entre autres le développement embryonnaire, la cicatrisation cutanée, l'ovulation et le remodelage des os (Yoon *et al.*, 2003). Ces enzymes ont également une importante fonction dans des conditions pathologiques qui sont caractérisées par la dégradation excessive de la MEC comme les métastases tumorales, l'arthrite rhumatoïde,

l'ostéoarthrite, les ulcères gastriques et l'artériosclérose (Westermarck et Kahari, 1999). La famille des MMPs est le principal groupe d'enzymes protéolytiques qui est impliqué dans l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogenèse (Chang et Werb, 2001; Nagase et Woessner, 1999; Westermarck et Kahari, 1999). Les MMPs sont des régulateurs essentiels de diverses phases du processus d'angiogenèse, de la rupture de la membrane basale des structures vasculaires à la prolifération et la migration des CEs (Pepper, 2001). À ce jour, 23 MMPs humaines ont été identifiées et plusieurs d'entre elles ont été caractérisées. Les MMPs présentent plusieurs propriétés communes : (a) elles contiennent un atome de zinc à leur site actif et sont inhibées par des agents chélateurs; (b) elles présentent des homologies de structure et de séquence; (c) elles sont produites sous une forme latente (zymogène) et sont activées par un clivage protéolytique partiel; (d) elles présentent une activité maximale à pH neutre et leur activité nécessite la présence de calcium et (e) elles sont inhibées spécifiquement par les TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteases*) (Mignatti et Rifkin, 1996).

La famille des MMPs présente une structure commune (Figure 1.7) composée d'un pré-prodomaine, un prodomaine, un domaine catalytique, un domaine charnière et un domaine homologue à l'hémopexine (PEX) excepté MMP-7, -23 et -26 qui ne possèdent pas de PEX (Seiki et Yana, 2003b). Les MMPs peuvent être classées en six groupes selon leurs différences structurales, mais elles peuvent être également divisées d'après leur structure et leur fonction, soit les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les métalloprotéases membranaires et les matrilysines. Contrairement aux autres classes de MMPs qui sont sécrétées par la cellule dans le milieu extracellulaire et peuvent donc agir à des sites plus éloignés, les MT-MMPs possèdent la caractéristique de pouvoir se lier à la membrane par l'intermédiaire d'un site hydrophobe transmembranaire présent dans leur domaine PEX ou par une ancre GPI (*glycosyl phosphatidyl inositol*) (Sounni *et al.*, 2003). La localisation membranaire des MT-MMPs fournit à ces enzymes une fonction unique puisqu'elles peuvent modifier le microenvironnement immédiat des cellules (Seiki, 2002).

### **1.5.2 Les métalloprotéases matricielles de type membranaire (MT-MMPs)**

Plusieurs données expérimentales indiquent que les MMPs qui sont intrinsèquement associées avec la membrane plasmique, les MT-MMPs, constituent des composantes clés de la protéolyse péricellulaire et jouent un rôle prédominant dans la migration et l'invasion cellulaire (Osenkowski, Toth et Fridman, 2004). Les MT-MMPs confèrent aux cellules une forte capacité invasive, beaucoup plus élevée que les MMPs solubles (Hotary *et al.*, 2000), suggérant un rôle important dans la croissance tumorale. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que ces enzymes sont fortement exprimées dans la majorité des types de cancers humains. En plus de leur rôle dans la dégradation de la MEC, les MT-MMPs interviennent dans l'activation des autres MMPs; par exemple, les MT-MMPs peuvent activer la proMMP-2 (Chakraborti *et al.*, 2003). La MT1- et MT2-MMP peuvent quant à elles activer la proMMP-13 (Knauper *et al.*, 1996). La MT1-, MT2- et MT3-MMP clivent plusieurs protéines de la MEC tandis que les substrats des MT4-, MT5- et MT6-MMP ne sont pas encore identifiés (Chakraborti *et al.*, 2003).

### **1.5.3 La métalloprotéase matricielle de type membranaire-1 (MT1-MMP)**

La MT1-MMP a été initialement identifiée comme un récepteur et un activateur spécifique de la proMMP-2 à la surface cellulaire (Sato *et al.*, 1994). Depuis sa découverte, la MT1-MMP a été très étudiée et est maintenant une des MMPs les mieux caractérisées (Itoh et Seiki, 2004). Elle est de plus en plus reconnue comme étant une enzyme essentielle impliquée dans le remodelage de la MEC, dans la migration de divers cellules cancéreuses et des CEs ainsi que dans l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Belien, Paganetti et Schwab, 1999; Koshikawa *et al.*, 2000; Lehti *et al.*, 2000; Rozanov *et al.*, 2001). Bien que plusieurs études aient montré un rôle important de la MT1-MMP dans l'angiogenèse, les mécanismes impliqués demeurent encore peu connus.

### 1.5.3.1 L'expression de la MT1-MMP dans les tumeurs

Ce rôle important est également suggéré par l'expression de la MT1-MMP dans plusieurs types de tumeurs dont le cancer du poumon, de l'estomac, du côlon, du foie, de la vessie, du cou et de la tête, de la thyroïde, de l'ovaire, les carcinomes cervicaux et les tumeurs cérébrales (Seiki, 2003a). Les niveaux d'expression de la MT1-MMP et d'activation de la proMMP-2 sont généralement corrélés avec un mauvais pronostic des patients atteints du cancer (Seiki, 2003a). De plus, l'utilisation d'un petit ARN interférent (siRNA) dirigé contre le gène de la MT1-MMP dans les cellules cancéreuses montre que la régulation négative de la MT1-MMP est suffisante pour inhiber l'invasion par ces cellules et ce, de façon significative (Ueda *et al.*, 2003). La MT1-MMP est fréquemment exprimée dans les cellules cancéreuses *in vitro* (Sato *et al.*, 1994; Seiki, 1999), suggérant qu'elle joue un rôle important dans la progression tumorale (Hotary *et al.*, 2003; Itoh et Seiki, 2004). L'inactivation du gène de la MT1-MMP chez la souris provoque de nombreux effets délétères, notamment au niveau de la croissance osseuse, provoquant un nanisme et la mort prématurée des animaux (Holmbeck *et al.*, 2004). La croissance des os longs, l'organisation des tissus mous, la formation et l'éruption des racines de molaire et le remodelage du cartilage crânien sont tous dépendants de la MT1-MMP (Holmbeck *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la MT1-MMP joue un rôle unique dans le remodelage de la MEC (Itoh et Seiki, 2006).

### 1.5.3.2 La régulation de la MT1-MMP

La MT1-MMP possède des domaines communs avec les autres membres de la famille des MMPs (figure 1.8) incluant un pré et un prodomaine (M<sup>1</sup>-R<sup>111</sup>), un domaine catalytique (Y<sup>112</sup>-G<sup>285</sup>), une région charnière (E<sup>286</sup>-I<sup>318</sup>), un domaine hémapexine (HPX) (C<sup>319</sup>-C<sup>508</sup>), une région de liaison (P<sup>509</sup>-S<sup>538</sup>), un domaine transmembranaire (A<sup>539</sup>-F<sup>562</sup>) qui lui vaut sa localisation à la surface cellulaire et une

courte portion cytoplasmique (R<sup>563</sup>-V<sup>582</sup>) qui semble importante dans l'activation de la migration cellulaire par l'enzyme (Brinckerhoff et Matrisian, 2002; Fillmore, VanMeter et Broaddus, 2001; Gingras *et al.*, 2001; Itoh et Nagase, 2002; Lehti *et al.*, 2000; Rozanov *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1994; Seiki, 2003a). Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP joue un rôle important dans l'endocytose de la protéine (Jiang *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001), dans l'activation de la cascade de signalisation médiée par ERK (Gingras *et al.*, 2001), dans l'induction du gène du VEGF (Sounni *et al.*, 2004) et dans la locomotion cellulaire (Gingras *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001; Rozanov *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001).

Tout comme les autres MMPs, la MT1-MMP est produite sous forme d'un zymogène (~ 63 kDa) et requiert une étape d'activation. La MT1-MMP possède un motif d'acides aminés basiques de RRKR<sup>111</sup> à la fin du propeptide qui est clivé par une convertase de proprotéine comme la furine (Sato *et al.*, 1996; Yana et Weiss, 2000). Ainsi, l'activation de la MT1-MMP a lieu durant sa sécrétion dans le Golgi (Mazzone *et al.*, 2004) et l'enzyme est exprimée à la surface cellulaire sous une forme active (~60 kDa) dans laquelle son domaine catalytique se retrouve dans l'espace extracellulaire (Osenkowski, Toth et Fridman, 2004). Il a également été montré que la MT1-MMP sous forme active peut subir des clivages par la MMP-2 et la MT1-MMP elle-même menant à une forme de ~44-45 kDa (Lehti *et al.*, 1998; Stanton *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2002). Cette forme est retrouvée dans plusieurs types cellulaires qui expriment l'enzyme constitutivement ou suite à l'expression de la MT1-MMP recombinante (Osenkowski, Toth et Fridman, 2004). Puisque l'expression de la forme de ~44 kDa est augmentée de façon significative dans les conditions où l'activation de la proMMP-2 est stimulée (Annabi *et al.*, 2001; Gingras *et al.*, 2000; Lehti *et al.*, 1998), la présence de cette forme a été associée à une augmentation de l'activité de la MT1-MMP (Lehti *et al.*, 1998; Osenkowski, Toth et Fridman, 2004).

Étant donné que la MT1-MMP est exprimée à la surface cellulaire sous une forme active, son inhibition est une des étapes critiques afin de pouvoir réguler son activité. La MT1-MMP est inhibée par des inhibiteurs endogènes tels que TIMP-2, -3 et -4 mais non par TIMP-1 (Bigg *et al.*, 2001; Will *et al.*, 1996). Un autre inhibiteur de la MT1-MMP est RECK (*reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs*), une glycoprotéine ancrée à la membrane par un groupement GPI (Oh *et al.*, 2001). De plus, de récentes observations ont montré que l'endostatine, un inhibiteur endogène de l'angiogenèse dérivé du collagène XVIII, peut inhiber l'activité catalytique de la MMP-2 et de la MT1-MMP (Kim *et al.*, 2000).

La MT1-MMP est internalisée par des voies dépendantes des clathrines et des cavéoles (Jiang *et al.*, 2001; Remacle, Murphy et Roghi, 2003; Uekita *et al.*, 2001), suggérant un mécanisme additionnel de régulation négative de son activité. Cependant, ce mécanisme semble complexe car l'internalisation est essentielle pour l'induction de la migration cellulaire par l'enzyme (Nakahara *et al.*, 1997). Ce processus de régulation de la MT1-MMP dépendant des clathrines est médié par sa portion cytoplasmique. Lorsque la portion LLY<sup>573</sup> est éliminée ou encore remplacée par des résidus alanine, l'internalisation de la MT1-MMP est inhibée et le mutant ne peut promouvoir la migration cellulaire (Uekita *et al.*, 2001). Des études ont également montré que la MT1-MMP est recyclée à la surface membranaire après l'internalisation. En effet, Wang *et al.* ont démontré que le C-terminal de la portion cytoplasmique, DKV<sup>583</sup>, est une séquence critique pour cette fonction. La délétion de DKV<sup>583</sup> inhibe le recyclage de la MT1-MMP. Il a aussi été rapporté qu'une protéine interagirait avec le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP nommée « *MT1-MMP cytoplasmic-binding protein-1* » (MTCBP-1) (Uekita *et al.*, 2004). La MTCBP-1 n'affecte pas l'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP mais supprime la migration cellulaire médiée par celle-ci (Itoh et Seiki, 2006).



#### 1.5.3.3 La localisation de la MT1-MMP

Lorsque les cellules sont stimulées et migrent, la MT1-MMP est relocalisée dans les lamellipodes, tel qu'illustré à la figure 1.9 (Galvez *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1997). Cette localisation polarisée semble particulièrement adéquate pour l'invasion des tissus par les cellules (Mori *et al.*, 2002). En effet, la concentration des MT1-MMPs dans les lamellipodes au front de migration (Itoh *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 1997) permet une régulation spatiotemporelle de la protéolyse de la MEC, facilitant l'invasion par les cellules tumorales et les CEs (Labrecque *et al.*, 2004).

#### 1.5.3.4 Les substrats de la MT1-MMP

Comme les cellules cancéreuses ont besoin de traverser la membrane basale afin d'arriver à envahir le tissu environnant et former des métastases, l'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP est considérée comme une étape cruciale dans ces processus (Sato *et al.*, 2005; Seiki, 2003a) et le mécanisme d'activation a été très étudié. Ce processus ne se résume pas en une simple interaction entre la proMMP-2 et la MT1-MMP, mais implique son inhibiteur endogène TIMP-2 (Strongin *et al.*, 1995). Par conséquent, la MT1-MMP joue un rôle majeur dans le remodelage de la MEC soit directement, en dégradant ces différents composés (Mori *et al.*, 2002) ou indirectement, par l'activation de la MMP-2 (Sato *et al.*, 1994). Ainsi, la MT1-MMP déclenche une cascade d'activation des MMPs à la surface cellulaire (Mori *et al.*, 2002).

En plus d'être un activateur de la proMMP-2, la MT1-MMP est également une enzyme dégradant un large éventail de protéines de la MEC (d'Ortho *et al.*, 1997; Pei et Weiss, 1996) incluant la fibrine (Hiraoka *et al.*, 1998), les collagènes de type I,

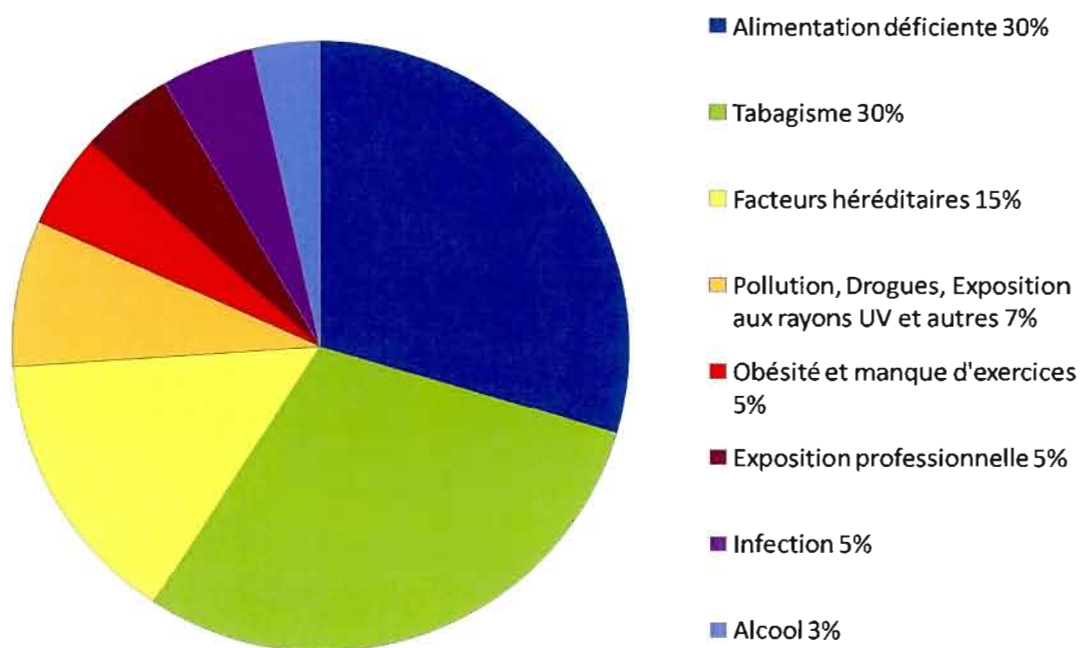
II et III, la gélatine, les laminines 1 et 5, la vitronectine, l'aggrecan, le lumican et la fibronectine (Annabi *et al.*, 2005; d'Ortho *et al.*, 1997; Egeblad et Werb, 2002; Hiraoka *et al.*, 1998; Koshikawa *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Ohuchi *et al.*, 1997). En plus de ces protéines structurales, la MT1-MMP possède également une activité protéolytique envers plusieurs molécules biologiques importantes (Sato *et al.*, 2005). En effet, la MT1-MMP peut cliver diverses protéines de surface cellulaire telles que CD44 (Annabi *et al.*, 2005; Kajita *et al.*, 2001), la transglutaminase (Belkin *et al.*, 2001), l'intégrine  $\alpha_v$  (Deryugina *et al.*, 2002) et le syndecan-1 (Endo *et al.*, 2003). Le rôle du clivage de ces protéines par la MT1-MMP demeure encore incompris mais semble toutefois important.

De plus, il a été démontré que l'expression de la MT1-MMP était un activateur de la protéine kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) et que l'activation de ERK était indispensable pour la migration cellulaire dépendante de la MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2001; Takino *et al.*, 2004). La façon dont la MT1-MMP active ERK n'est pas encore clairement établie, mais elle pourrait provenir du mécanisme du clivage de CD44 ou de syndecan-1 impliqué dans la migration cellulaire (Itoh et Seiki, 2006). Par exemple, CD44 entraîne l'association de la MT1-MMP avec le cytosquelette d'actine au front de migration cellulaire (Mori *et al.*, 2002) et le clivage de CD44 par la MT1-MMP est corrélé avec une hausse de migration (Kajita *et al.*, 2001). Ce phénomène semble important, car la surexpression d'un mutant de CD44 comprenant une délétion de son domaine cytoplasmique inhibe l'association de la MT1-MMP avec l'actine et abolit complètement la localisation de la MT1-MMP dans les lamellipodes (Mori *et al.*, 2002) suggérant que l'association avec l'actine est critique pour la localisation de CD44 et de la MT1-MMP au front cellulaire (Itoh et Seiki, 2006).

## 1.6 Objectifs de l'étude

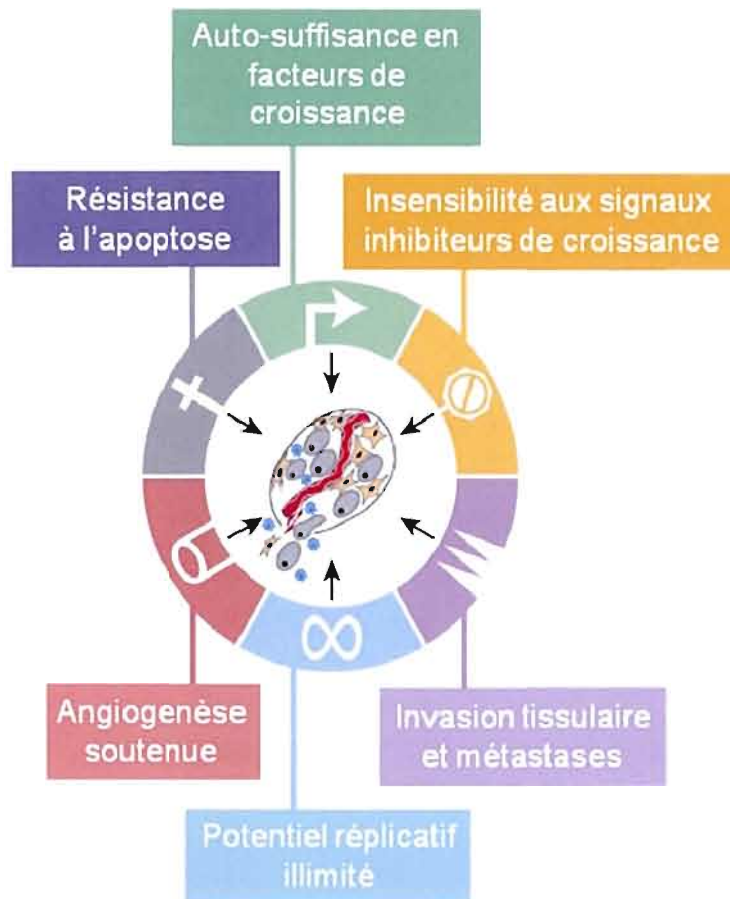
L'angiogenèse est nécessaire afin de permettre la croissance tumorale et la formation de métastases. La formation de nouveaux vaisseaux est subtilement régulée au niveau moléculaire et comprend diverses étapes dont la fibrinolyse, la migration et l'invasion des CEs. Maintes observations ont montré l'importance du système de coagulation dans la stimulation de l'angiogenèse. Parmi les joueurs clés de ce processus, il est clairement établi que la MT1-MMP joue un rôle crucial en stimulant la dégradation de la MEC, la migration des CEs ainsi que la formation de structures capillaires *in vitro* et *in vivo*. Cependant les mécanismes du fonctionnement de cette enzyme restent peu compris. De plus, les plaquettes sont connues pour libérer des lipides bioactifs dont la S1P. L'identification de la S1P comme un activateur majeur des fonctions de la MT1-MMP dans les CEs représente une nouvelle voie reliant l'hémostase et l'angiogenèse.

Il a été précédemment démontré que la MT1-MMP coopère avec la S1P afin d'induire la migration des cellules endothéliales ainsi que la différenciation morphogénique par un mécanisme dépendant des caspases (Langlois *et al.*, 2005) et qu'elle stimulerait la migration cellulaire par la transactivation de l'EGFR. (Langlois *et al.*, 2005; Langlois, Gingras et Beliveau, 2004; Langlois *et al.*, 2007). De plus, plusieurs études ont montré que l'effet de stimulation de la S1P sur la migration des CEs implique une extension rapide de lamellipodes riches en actine au front principal de migration et que ce processus est corrélé avec la relocalisation de p130Cas du cytosol aux replis membranaires. Nos objectifs ont donc été de démontrer une interaction potentielle de la MT1-MMP avec p130Cas et d'étudier l'effet de la S1P sur la relocalisation de ces deux protéines.



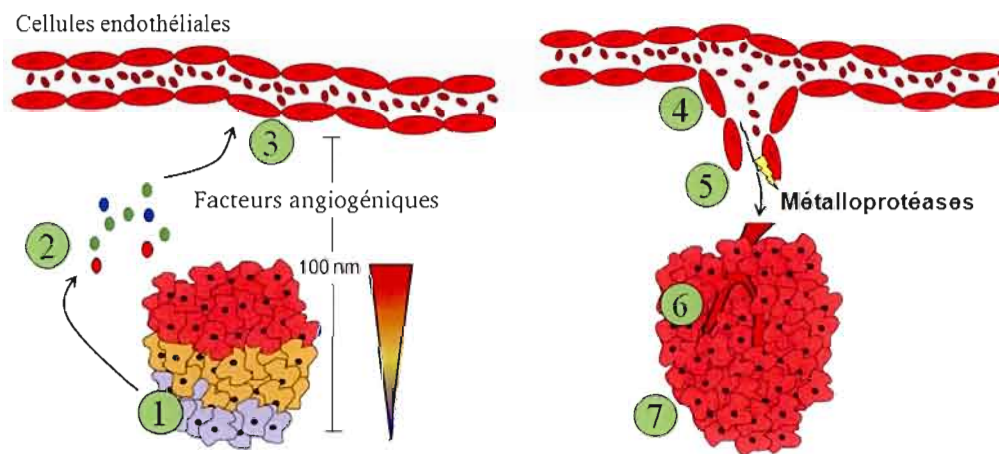
**Figure 1.1 Les facteurs de risques du cancer**

Le cancer est causé par divers facteurs associés à de mauvaises habitudes de vie dont le tabagisme, l'obésité et le manque d'exercice ainsi qu'une alimentation déficiente. Il peut être également dû aux facteurs héréditaires, aux infections, à une exposition professionnelle, à l'alcool, à la pollution, aux drogues, à une exposition aux rayons UV, etc. Figure adaptée de Béliveau et Gingras, 2005.



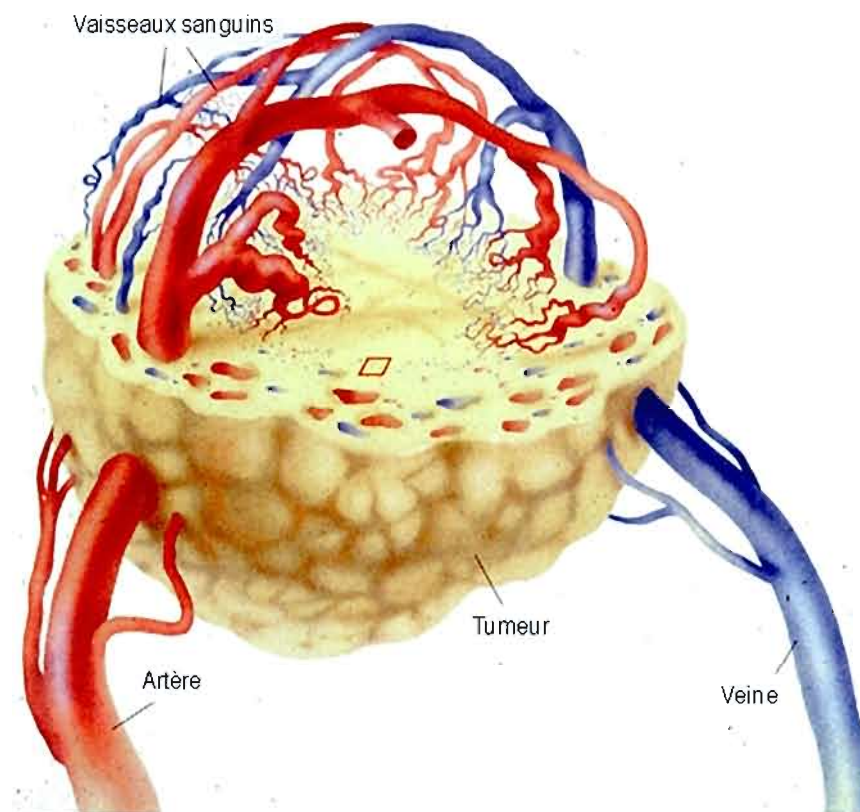
**Figure 1.2 Les six altérations essentielles de la physiologie cellulaire provoquant la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse**

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par six altérations essentielles de leur physiologie, soit la résistance à l'apoptose, l'auto-suffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'invasion tissulaire et les métastases, le potentiel réplcatif illimité et l'angiogenèse soutenue. Figure adaptée de Hanahan et Weinberg, 2000.



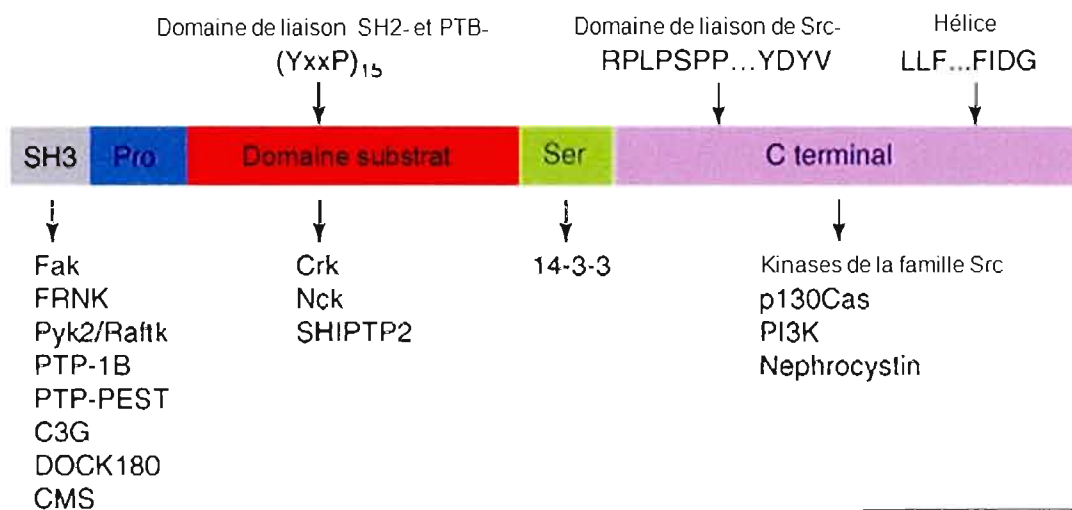
**Figure 1.3 L'angiogenèse tumorale**

La cellule cancéreuse, comme toutes les cellules de l'organisme, est extrêmement dépendante de son apport énergétique en oxygène et en nutriments pour croître. Pour y arriver, les tumeurs, dès qu'elles atteignent 1 à 2 mm<sup>3</sup> manquent de nutriments et d'oxygène (1) et sécrètent de nombreuses cytokines (2). Ces cytokines vont aller rejoindre les vaisseaux environnants, stimulant les CEs qui constituent le vaisseau. Pour ce faire, des métalloprotéases situées à la périphérie des CEs vont dégrader la matrice extracellulaire (3,4) permettant aux CEs de se frayer un chemin et de migrer jusqu'à la tumeur (5). La formation d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins permet à la tumeur de retrouver l'énergie et l'oxygène nécessaire à sa croissance et à son expansion dans les tissus avoisinants (6,7).



**Figure 1.4 Le développement d'un réseau de capillaires alimentant une tumeur**

Le développement d'un réseau de capillaires augmente l'interaction entre la tumeur et les tissus environnants, augmentant par le fait même le risque de métastases par les cellules cancéreuses qui s'échappent dans la circulation sanguine.

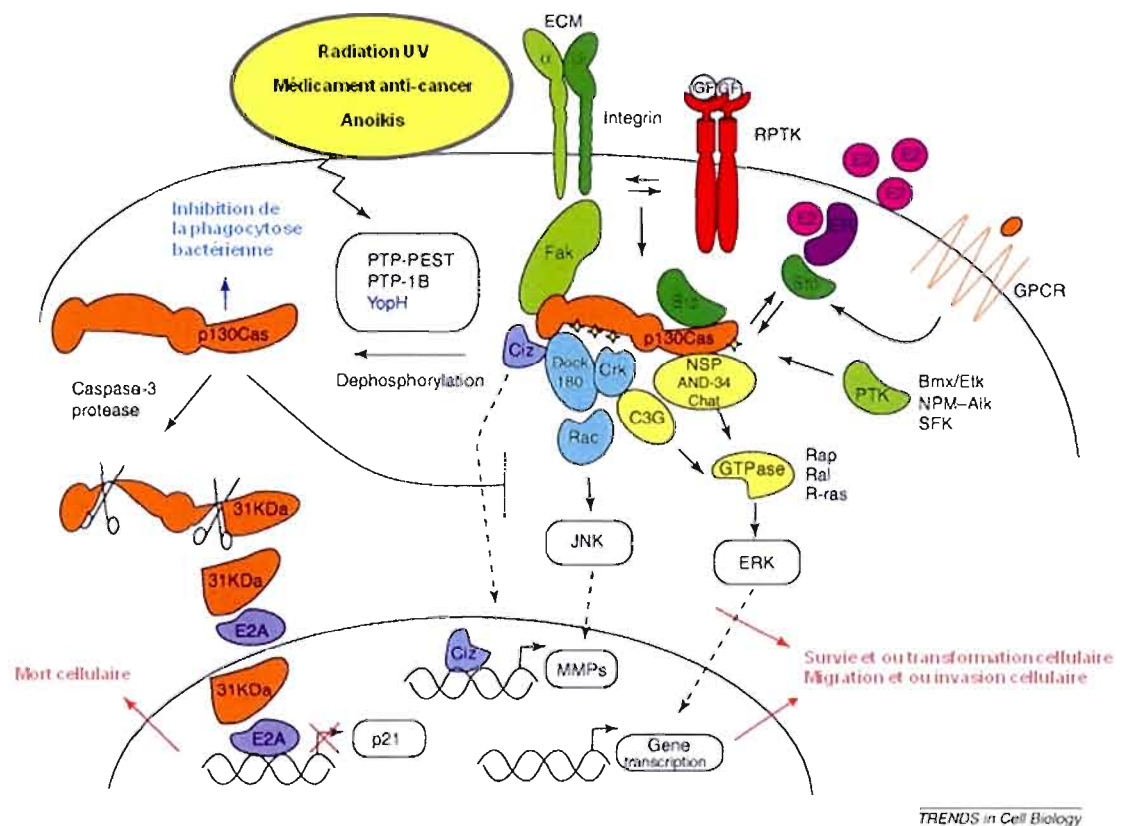


*TRENDS in Cell Biology*

**Figure 1.5 Les caractéristiques structurales de la protéine p130Cas**

La protéine p130Cas est une protéine d'arrimage contenant de multiples domaines d'interactions protéine-protéine incluant un domaine SH3 N-terminal, un domaine liant Src près du C-terminal et un domaine substrat interne caractérisé par 15 motifs Tyr-X-X-Pro (YxxP). Figure adaptée de Defilippi, P. *et al.*, 2006.

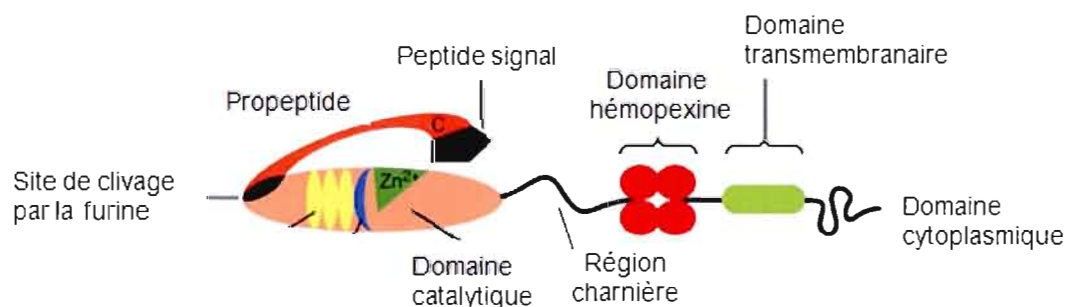




TRENDS in Cell Biology

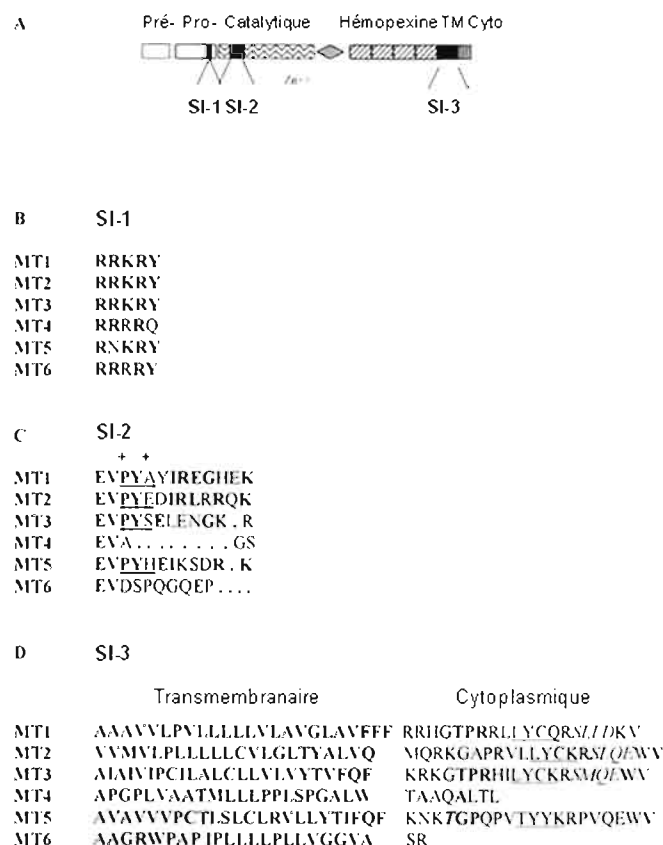
**Figure 1.6 Les voies de signalisation impliquant p130Cas**

p130Cas est une protéine d'échafaudage qui peut promouvoir les interactions protéine-protéine, menant à la formation de complexes multi-protéiques. L'interaction de p130Cas avec d'autres protéines dans des cellules normales module la motilité, la survie ainsi que la prolifération cellulaire. De plus, p130Cas joue un rôle dans la transformation cellulaire ainsi que dans la progression cancéreuse. Figure adaptée de Defilippi, P. *et al.*, 2006.



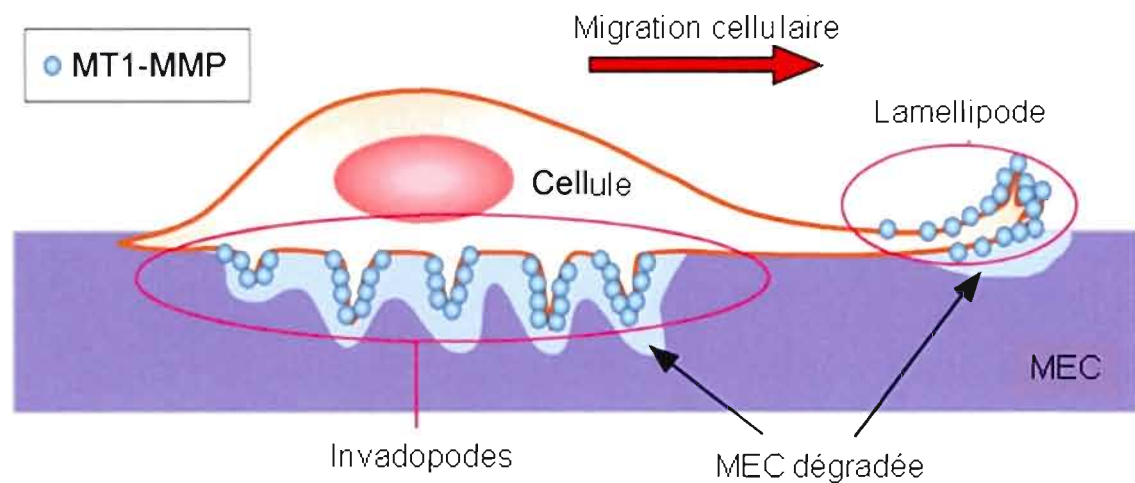
**Figure 1.7 Les domaines variables des MMPs**

La famille des MMPs présente une structure de domaines commune composée d'un prédomaine, un propeptide, un domaine catalytique qui contient un atome de zinc, un domaine charnière et un domaine homologue à l'hémopexine. Le peptide signal est nécessaire afin d'acheminer les MMPs jusqu'à la surface cellulaire, le prodomaine maintient l'activité de ces enzymes sous une forme latente, le domaine catalytique des MMPs contient un atome de zinc, le clivage du prodomaine libère l'atome de zinc et entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat. Le domaine PEX intervient quant à lui dans la reconnaissance de substrats des MMPs. Les métalloprotéases membranaires (MT-MMPs) possèdent la caractéristique de pouvoir se lier à la membrane par l'intermédiaire d'un site hydrophobe transmembranaire présent à proximité de leur domaine PEX et certaines d'entre elles possèdent une portion cytoplasmique. Figure adaptée de Lafleur *et al.*, 2003.



**Figure 1.8 Les séquences insérées dans les MT-MMPs**

Les MT-MMPs présentent une structure de domaines commune aux MMPs en plus de trois séquences homologues insérées (SI-1, SI-2 et SI-3). (A) Représentation schématique de la position des trois séquences insérées dans les domaines fonctionnels connus des MMPs. (B) Séquence insérée-1. (C) Séquence insérée-2. (D) Séquence insérée-3. Ainsi, la première séquence (SI-1) se retrouve dans le pro-domaine, la seconde (SI-2) dans le domaine catalytique et la dernière (SI-3) dans les domaines transmembranaire et cytoplasmique. Figure adaptée de Fillmore *et al.*, 2001.



**Figure 1.8 La localisation de la MT1-MMP dans la migration cellulaire**

L'ancrage de la MT1-MMP à la membrane cellulaire est requis pour son activité invasive. Lorsque les cellules sont stimulées et qu'elles migrent, la MT1-MMP est relocalisée dans les lamellipodes et cette localisation polarisée semble particulièrement adéquate pour l'invasion contrôlée des tissus environnants. En effet, afin d'arriver à une dégradation focale, la cellule localise ces MT1-MMPs dans les lamellipodes, au front de migration des cellules. Figure adaptée de Itoh *et al.*, 2006.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel

##### 2.1.1 Général

Le milieu de culture EBM-2 ainsi que les suppléments EGM-2 (*Endothelial Cell Growth Medium BulletKit-2*) ont été achetés chez Cambrex (Walkersville, MD), la trypsine pour cellules endothéliales a été obtenue de GibcoBRL Life Technologies (Burlington, ON) et les sérums de Hyclone Laboratories (Logan, UT). L'ensemble des solutions nécessaires pour le dosage des protéines selon la méthode du  $\mu$ BCA a été acheté chez Pierce (Rockford, IL). Les appareils et les réactifs d'électrophorèse SDS-PAGE et d'immunobuvardage ont tous été achetés de Bio-Rad (Hercules, CA). Les membranes de PVDF pour l'immunobuvardage et le réactif de chimioluminescence (ECL) ont été achetés chez PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Les inhibiteurs PP2 et AG1478 ont été obtenus chez Calbiochem (VWR) (Mont-Royal, QC). La sphingosine-1-phosphate, l'orthovanadate, le bis-benzimide (Hoechst), le triton, la phalloïdine, la toxine pertussique ainsi que le fluorure de sodium ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). La fibronectine a été achetée chez Roche Diagnostics (Laval, QC). L'albumine sérique bovine a été obtenue de Techniscience (Terrebonne, QC). Les billes de sépharose couplées aux protéines A ou G ont été achetées chez GE HealthCare Bio-Sciences Inc. (Baie-d'Urfé, QC). Le petit ARN interférent (siRNA) servant de contrôle et le siRNA dirigé contre la MT1-MMP ont été achetés chez Qiagen (Mississauga, ON). Le spectrophotomètre est de marque Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

### **2.1.2 Les anticorps**

Les anticorps polyclonaux (AB815) et monoclonaux (MAB3328) dirigés contre MT1-MMP ont été obtenus de Chemicon International (Temecula, CA). Les anticorps dirigés contre p130Cas, Crk et paxilline ont été achetés de BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON). L'anticorps dirigé contre pY (pY99) a été acheté chez Santa Cruz biotechnologies Inc. (Santa Cruz, CA). Les anticorps dirigés contre phospho-p130Cas (Y410) et FAK ont été achetés chez Cell Signaling Technology (Mississauga, ON). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris couplés à la peroxydase de raifort ont été obtenus de Jackson ImmunoResearch (Mississauga, ON). Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa 488 (anti-souris) ou à la tétraméthylrhodamine (anti-lapin) ont été achetés de Molecular Probes (Invitrogen) (Burlington, ON). Finalement, l'anticorps phospho-MT1-MMP (Y573) a été produit pour notre laboratoire par 21<sup>st</sup> Century Biochemicals (Marlboro, MA).

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1 Culture cellulaire**

Les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVECs) provenant de Clonetics (San Diego, CA) ont été cultivées à 37 °C sous une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air dans le milieu basal pour cellules endothéliales EBM-2 contenant des suppléments EGM-2 (*Endothelial Cell Growth Medium BulletKit-2*). Les HUVECs ont été utilisées jusqu'au passage 5.

## **2.2.2 Immunoprécipitation et immunodétection**

### *2.2.2.1 Stimulation des cellules*

Les cellules ont été ensemencées sur des pétris de 100 mm préalablement recouverts avec de la fibronectine (10 µg/mL) toute la nuit à 4 °C. Après 24 h de croissance, les cellules ont été sevrées dans le milieu EBM-2 contenant 1% de sérum fœtal bovin (FBS) et ce, durant environ 18 h. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec la S1P (1 µM) sans changer le milieu durant plusieurs temps prédéterminés. Cette concentration a été choisie puisqu'elle représente une concentration plasmatique (Goetzl *et al.*, 2004). Dans certains cas, les cellules ont été préincubées 6 h avant la stimulation avec la toxine pertussique (10 ng/mL), un inhibiteur de la voie des protéines G<sub>i</sub>, 2 h avec AG1478 (100 mM), un inhibiteur des récepteurs à l'EGF ou PP2 (10 µM), un inhibiteur spécifique de la famille des kinases Src.

### *2.2.2.2 Inhibition de l'expression du gène de la MT1-MMP à l'aide d'un petit ARN interférent (siRNA)*

Le petit ARN interférent spécifique pour le gène de la MT1-MMP a été synthétisé en utilisant la séquence située entre les nucléotides 228 à 248 du gène de l'enzyme soit 5'-AACAGGCAAAGCTGATGCAGA-3' (Deryugina *et al.*, 2005). Un siRNA ayant une séquence aléatoire (5'-AATTCTCCGAACGTGTACGT-3') a été utilisé comme contrôle négatif. Les cellules ont été transfectées à une confluence de 70% avec 100 nM de chacun des siRNA à l'aide de l'Oligofectamine (Invitrogen). La transfection de siRNA est transitoire et se fait sur une période de 48 h suivie d'un traitement d'environ 24 h et l'efficacité de transfection et le maintien à la baisse des niveaux de MT1-MMP ont été confirmés par immunobuvardage à la figure 3.7. Les

cellules transfectées ont été sevrées et stimulées par la S1P tel que décrit précédemment.

#### *2.2.2.3 Préparation des lysats cellulaires*

Les cellules ont été récoltées et lysées avec un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 1 % de SDS, 1 mM d'orthovanadate ainsi que 1 mM de fluorure de sodium préalablement chauffé 5 minutes à 100 °C. Le lysat récolté est également chauffé 5 minutes à 100 °C. Finalement, les lysats ont été homogénéisés à l'aide de deux passages successifs des cellules à travers une seringue d'un diamètre de 20G (1½) suivi de deux passages successifs à travers une seringue d'un diamètre de 26G (½).

#### *2.2.2.4 Dosage des protéines*

La quantité de protéines contenues dans les lysats cellulaires a été dosée selon la méthode microBCA en utilisant l'albumine sérique de bœuf (BSA) comme protéine standard. Un mL d'eau a été ajouté à 1 mL de réactif contenant les lysats afin de déterminer leur concentration en protéines. Suite à une courte agitation, le mélange a été chauffé durant 30 minutes à 60 °C. La lecture au spectrophotomètre a été faite à 562 nm.

#### *2.2.2.5 Immunoprécipitation*

Afin d'étudier les associations protéine-protéine, un volume de lysat contenant 250 µg de protéines a été dilué dans 1 mL de tampon de lyse (150 mM de NaCl, 10



mM de Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 0,5 % de Nonidet P-40, 1 % de Triton X-100 et 60 mM de n-octylglucoside) contenant 1 mM d'orthovanadate et 1 mM de fluorure de sodium en présence de 1 µg/mL d'anticorps spécifique. Après agitation pendant une nuit à 4°C, les complexes immuns ont été récupérés à l'aide de 20 µL d'une suspension de billes de sépharose couplées aux protéines A ou G pendant 2 heures. Les complexes ont été par la suite récoltés par centrifugation de 2 minutes à 4500 rpm à 4 °C et les protéines liées de façon non spécifique ont été éliminées à l'aide de deux lavages successifs faits avec 1 mL de tampon de lyse. Finalement, 20 µL de tampon d'échantillon de Laemmli 2X (contenant 62,5 mM de Tris-HCl pH 6.8, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (p/v) de SDS, 5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol et 0,00625 % (p/v) de bleu de bromophénol) ont été ajoutés au culot, qui a été chauffé 5 minutes à 100 °C, vortexé puis centrifugé 3 minutes à 4500 rpm.

#### *2.2.2.6 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western*

Les échantillons de lysats cellulaires totaux (10 µg) ont été déposés sur gel SDS-PAGE contenant 7,5 % de polyacrylamide (p/v). Les gels de séparation contenaient 7,5 % (p/v) d'acrylamide, 0,2 % (p/v) de N, N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de Tris-HCl pH 8.8, 0,1 % (p/v) de SDS, 1 µL/mL de N, N, N', N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/mL de persulfate d'ammonium (APS) tandis que les gels d'entassement étaient composés de 3,8 % (p/v) d'acrylamide, 0,1 % (p/v) N, N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris-HCl pH 6.8, 0,1 % (p/v) de SDS, 1 µL/mL de TEMED et 0,5 mg/mL d'APS. La migration a été effectuée à 100 volts (voltage constant) pendant 90 minutes sur un système d'électrophorèse Mini-Protean III et ce, dans un tampon d'électrophorèse contenant 192 mM de glycine, 20 mM de Tris et 0,1 % de SDS (p/v).

Les protéines ont été transférées pendant 90 minutes sur une membrane de PVDF de 0,45 µm de porosité en présence de tampon de transfert constitué de 96 mM de glycine, 10 mM de Tris, 10 % (v/v) de méthanol et 0,0025 % (v/v) de SDS. Les sites non spécifiques sur la membrane ont été bloqués en incubant celle-ci toute la nuit à 4 °C dans une solution de TBS-Tween (150 mM de NaCl et 20 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0,1 % (v/v) de Tween 20) contenant 3 % d'albumine sérique bovine (BSA).

#### *2.2.2.7 Immunodétection des protéines*

Les membranes de PVDF ont été incubées 1 heure dans une solution d'anticorps primaire (dilué 1/1000) diluée dans du TBS-Tween contenant 3 % (p/v) de BSA et 0,05 % (p/v) de NaN<sub>3</sub>. Après quatre lavages de 15 minutes avec le TBS-Tween, les membranes ont été incubées 1 heure dans une solution de TBS-Tween contenant des anticorps secondaires (dilués 1/10000) conjugués à la peroxydase de raifort. Les membranes ont de nouveau été lavées quatre fois pendant 15 minutes, incubées 1 minute dans la solution d'ECL et ont finalement été révélées à l'aide d'un film Fuji.

#### *2.2.3 Immunofluorescence et microscopie confocale*

Les HUVEC ont étéensemencées sur des lamelles enduites de fibronectine (10 µg/mL) et incubées dans du milieu EBM-2 complet pendant 24 h à 37 °C. Les cellules ont été par la suite sevrées pendant 18 h dans un milieu EBM-2 contenant 1% de FBS. Après stimulation de 5 ou 15 minutes avec la S1P (1 µM), les noyaux des cellules ont été marqués au Hoechst (1/1000) durant 5 minutes. Les cellules ont été ensuite fixées 15 minutes à l'aide de formaldéhyde (3,7%), perméabilisées par le

Triton X-100 (0,2%) pendant 5 minutes et les interactions non spécifiques ont été bloquées pendant 30 minutes à l'aide de 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée dans du TBS-Tween. Les cellules ont été ensuite incubées 30 minutes avec l'anticorps spécifique dirigé contre MT1-MMP (AB815 ou MAB3328, 1/100), p130Cas (1/100), Crk (1/100), FAK (1/100), paxilline (1/100), phospho(Y410)p130Cas (1/100) ou phospho(Y573)MT1-MMP (1/10). Les cellules ont été par la suite incubées 30 minutes avec l'anticorps secondaire conjugué à l'Alexa fluor 488 ou à la tétraméthylrhodamine (1/500) et les lamelles ont été montées avec l'Immuno-Fluore mounting medium (MP Biomedicals). L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 META. Le cytosquelette d'actine a été marqué par la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (1/4000) pendant 5 minutes. Tous les anticorps ont été dilués dans le BSA alors que le Hoechst et la phalloïdine ont été dilués dans le PBS.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### **3.1 La S1P induit la localisation de p130Cas et de Crk aux replis membranaires dans les cellules endothéliales**

Bien que p130Cas soit localisée dans les adhésions focales dans plusieurs types cellulaires (Needham et Rozengurt, 1998; Rozengurt, 1998), d'autres études ont démontré sa concentration dans les replis membranaires des CEs, cette localisation étant associée à un rôle de la protéine dans la migration cellulaire (Cheresh, Leng et Klemke, 1999; Klemke *et al.*, 1998).

Afin de montrer la localisation de p130Cas et de Crk dans les replis membranaires, nous avons premièrement examiné l'effet de la S1P sur leur interaction en utilisant des procédures d'immunoprécipitation. Les HUVECs ont été ensemencées sur la fibronectine, sevrées, stimulées avec la S1P et les protéines des lysats cellulaires ont été immunoprécipitées à l'aide d'anticorps dirigés contre p130Cas ou Crk. Ces cellules ont été choisies puisqu'elles représentent un modèle bien caractérisé de CEs en culture. Tel qu'illustré à la figure 3.1, p130Cas et Crk forment un complexe dans les CEs non stimulées et l'addition de S1P induit une légère augmentation de cette association qui coïncide avec une hausse de la phosphorylation de p130Cas. Ces observations sont en accord avec des résultats antérieurs montrant que Crk, via son domaine SH2, interagit avec les tyrosines

phosphorylées de p130Cas suite à la stimulation des CEs par la S1P (Ohmori *et al.*, 2001). Par contre, cet effet de la S1P semble mineur car l'immunoprécipitation de Crk ne montre pas d'augmentation significative de p130Cas dans les complexes immuns. Ces résultats indiquent donc que dans les conditions expérimentales utilisées, p130Cas et Crk interagissent de façon constitutive. Cependant, puisque la plus forte phosphorylation de p130Cas s'observe à un temps de 15 minutes, ce temps de stimulation a été utilisé pour les expériences subséquentes.

Deux hypothèses ont donc été émises quant à la localisation de p130Cas dans les cellules. Certaines études suggèrent que la protéine se localise dans les adhésions focales (Nakamoto *et al.*, 1997) alors que d'autres observent une localisation dans les replis membranaires (Klemke *et al.*, 1998). Par conséquent, nous avons vérifié ces deux voies à l'aide de la microscopie confocale. Comme la migration cellulaire requiert une réorganisation continue du cytosquelette d'actine à l'intérieur des cellules (Lauffenburger et Horwitz, 1996; Mitchison et Cramer, 1996), nous avons comparé l'effet de la S1P sur la relocalisation de p130Cas et Crk aux structures périphériques riches en actine. Les HUVECs ont été ensemencées sur des lamelles enduites de fibronectine, sevrées, stimulées 15 minutes à la S1P et incubées avec des anticorps dirigés contre p130Cas ou Crk ainsi qu'avec la phalloïdine afin de visualiser le cytosquelette d'actine. Comme nous pouvons le constater à la figure 3.2, la stimulation des CEs par la S1P induit une relocalisation de p130Cas et de Crk à la périphérie des cellules, cette localisation étant située au niveau de l'actine corticale des cellules (en jaune). Cette translocation de p130Cas et de Crk à la périphérie suggère donc une localisation aux replis membranaires et non pas dans les adhésions focales (Ohmori *et al.*, 2001). Il est également connu que le complexe Crk-p130Cas joue un rôle dans la migration cellulaire médiée par les intégrines dans plusieurs systèmes (Klemke *et al.*, 1998; Vuori *et al.*, 1996).

Ces résultats sont en accord avec les études montrant que l'activation des cellules par la S1P mène à la polymérisation de l'actine conduisant à l'extension de lamellipodes et à la migration cellulaire (Vouret-Craviari *et al.*, 2002) et que ce processus concorde avec la relocalisation de p130Cas, principalement localisée dans le cytoplasme dans un état stable, vers les replis membranaires (Klemke *et al.*, 1998; Ohmori *et al.*, 2001).

### **3.2 La S1P induit le transfert de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire**

Afin de déterminer une association entre MT1-MMP et p130Cas et leur localisation subcellulaire, nous avons d'abord comparé l'effet de la S1P sur la relocalisation de MT1-MMP aux structures périphériques riches en actine. Les HUVECs ont étéensemencées sur des lamelles enduites de fibronectine, sevrées, stimulées 15 minutes à la S1P et incubées avec des anticorps dirigés contre la MT1-MMP et la phalloïdine afin de visualiser le cytosquelette d'actine. Comme le montre la figure 3.3, la MT1-MMP est relocalisée à la périphérie membranaire suite à la stimulation avec la S1P et cette relocalisation se produit au niveau de régions riches en actine (flèches). Cependant, nous remarquons que ce ne sont pas tous les replis membranaires qui contiennent la MT1-MMP, suggérant une localisation polarisée de l'enzyme durant la migration cellulaire médiée par la S1P.

Contrairement à son effet de stimulation sur la formation des replis membranaires, la S1P a plutôt un effet de stimulation général sur la formation des adhésions focales et la MT1-MMP ne s'associe pas avec ces structures, tel que visualisé par l'absence de colocalisation de la MT1-MMP avec FAK ou avec la paxilline (Figure 3.4), deux protéines associées aux complexes d'adhésion focale. Ces résultats suggèrent que p130Cas et MT1-MMP s'associent dans les replis

membranaires mais non aux adhésions focales, suite à la stimulation des CEs par la S1P.

### **3.3 La S1P induit l'interaction des protéines MT1-MMP et p130Cas**

Nous avons ensuite examiné la colocalisation de la MT1-MMP avec p130Cas en utilisant la microscopie confocale et des procédures d'immunoprécipitation. Les HUVECs ont été stimulées par la S1P et la colocalisation a été observée en incubant les cellules avec des anticorps dirigés contre la MT1-MMP et p130Cas. Comme nous pouvons l'observer à la figure 3.5, les deux protéines sont relocalisées dans des endroits précis à la périphérie cellulaire suite à la stimulation des cellules avec la S1P (flèches).

L'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas dépendante de la S1P a également été observée en utilisant des procédures d'immunoprécipitation. Les cellules ont été stimulées avec la S1P (1  $\mu$ M) pendant différentes périodes de temps et l'association a été examinée par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre p130Cas. Comme nous pouvons le remarquer à la figure 3.6, la S1P induit l'association de p130Cas avec la MT1-MMP, cette interaction coïncidant avec l'augmentation de la phosphorylation de p130Cas.

La spécificité de l'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas a été vérifiée à l'aide d'une inhibition de l'expression de la MT1-MMP. Les cellules transfectées avec un siRNA témoin ou avec un siRNA dirigé contre le gène de la MT1-MMP ont été stimulées avec la S1P (1  $\mu$ M) et l'association a été détectée par immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre p130Cas. Comme nous pouvons de nouveau

voir sur la figure 3.7, la S1P induit de façon dépendante du temps, une augmentation de la phosphorylation des tyrosines de p130Cas qui est corrélée avec son association avec la MT1-MMP. De plus, l'ajout d'un siRNA dirigé contre la MT1-MMP aux CEs n'a aucun effet sur la phosphorylation de p130Cas induite par la S1P mais inhibe complètement son interaction avec la MT1-MMP, ce qui confirme que la protéine contenue dans les complexes immuns correspond bien à la MT1-MMP.

### **3.4 La phosphorylation des tyrosines de p130Cas est importante pour la formation du complexe p130Cas/MT1-MMP**

p130Cas a été identifiée pour la première fois dans les cellules transformées par v-Src ou v-Crk comme étant une protéine de 130 kDa possédant des tyrosines phosphorylées (Sakai *et al.*, 1994). Le clonage moléculaire de la protéine a par la suite montré que p130Cas est une protéine adaptatrice avec de multiples domaines d'interactions protéine-protéine incluant un domaine SH3 N-terminal, un domaine liant Src et un domaine substrat qui est caractérisé par 15 motifs Tyr-X-X-Pro (YxxP) et qui inclut le site majeur où p130Cas subit la phosphorylation de ces tyrosines (Fonseca *et al.*, 2004; Nakamoto *et al.*, 1996). Puisque la phosphorylation des tyrosines de p130Cas dépendante de la S1P est impliquée dans la migration des CEs (Ohmori *et al.*, 2001; Panetti, 2002), la similitude entre la cinétique de la phosphorylation de p130Cas et son association avec la MT1-MMP (Figure 3.6) suggère que la phosphorylation de p130Cas joue un rôle important dans l'interaction avec cette enzyme.

Afin d'explorer cette possibilité, nous avons étudié l'interaction de la MT1-MMP avec les tyrosines phosphorylées de p130Cas en utilisant des anticorps dirigés contre la tyrosine 410 phosphorylée, un acide aminé localisé dans le domaine



substrat de la protéine (Fonseca *et al.*, 2004). Ces anticorps polyclonaux dirigés contre p130Cas phosphorylée ne sont pas spécifiques envers un seul résidu tyrosine situé dans le domaine substrat mais sont néanmoins très sélectifs envers la forme phosphorylée de p130Cas (Fonseca *et al.*, 2004). Dans les CEs stimulées à la S1P, ces anticorps reconnaissent une protéine qui a un poids moléculaire et une cinétique de phosphorylation de ces tyrosines identiques à ceux de p130Cas et, encore une fois, l'immunoréactivité est corrélée avec l'association de p130Cas avec la MT1-MMP (Figure 6).

Pour vérifier l'impact de la phosphorylation de p130Cas sur son interaction avec la MT1-MMP, nous avons examiné l'effet de la toxine pertussique, un inhibiteur de la voie de signalisation médiée par la protéine Gi et qui est connue pour abolir la phosphorylation des tyrosines de p130Cas dépendante de la S1P dans les HUVECs (Ohmori *et al.*, 2001). En accord avec ces observations, la préincubation des cellules avec la toxine inhibe complètement la phosphorylation des tyrosines de p130Cas dépendante de la S1P et abolit également son association avec la MT1-MMP (Figure 3.8). Par contre, la préincubation des cellules avec l'inhibiteur du récepteur à l'EGF, AG1478, n'a pas d'effet sur la phosphorylation des tyrosines de p130Cas ni sur son association avec la MT1-MMP (Figure 3.8), suggérant que la transactivation d'EGFR dépendante de la S1P et de la MT1-MMP précédemment démontrée (Langlois *et al.*, 2007) n'est pas impliquée dans la formation de ce complexe. Afin de vérifier ce résultat nous aurions pu utiliser un contrôle positif en réalisant une immunodétection de la phosphorylation d'EGFR. Nous avons également vérifié l'impact de la phosphorylation à l'aide de l'inhibiteur PP2. En effet, il a déjà été montré que dans les HUVECs exposées à un stress, Src phosphoryle p130Cas (Okuda *et al.*, 1999) et que la phosphorylation des tyrosines de p130Cas pouvait être inhibée par des inhibiteurs spécifiques de la famille des kinases Src telles que PP2 (Ohmori *et al.*, 2001). Comme nous le remarquons sur la figure 3.9, la préincubation des cellules avec l'inhibiteur PP2 inhibe complètement la

phosphorylation des tyrosines de p130Cas dépendante de la S1P et abolit également son association avec la MT1-MMP.

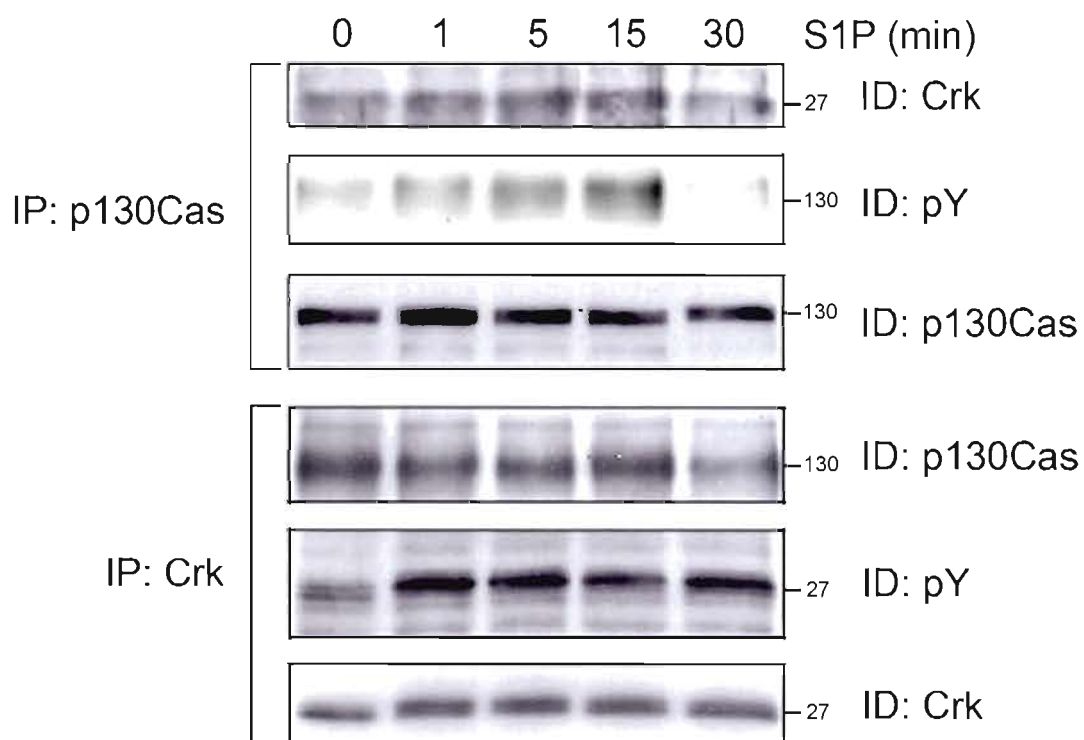
L'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas phosphorylée (pp130Cas) a par la suite été examinée par immunoprécipitation et microscopie confocale. L'incubation des lysats provenant des cellules stimulées à la S1P avec l'anticorps dirigé contre pp130Cas montre la présence de la MT1-MMP dans les complexes immuns (Figure 3.10), indiquant que la MT1-MMP interagit avec la forme phosphorylée de p130Cas. En accord avec cette observation, l'analyse en microscopie confocale a montré que la présence de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire augmente rapidement après la stimulation à la S1P, apparaissant dans des structures ponctuées au front migratoire de la cellule, colocalisant avec pp130Cas (Figure 3.11, résultats du haut). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que l'association de la MT1-MMP avec p130Cas requiert la phosphorylation des tyrosines de cette protéine contenues dans son domaine substrat. De plus, puisque l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines de p130Cas est nécessaire afin que les CEs réagissent à la S1P (Cheresh, Leng et Klemke, 1999), la colocalisation de la MT1-MMP avec p130Cas phosphorylée à la périphérie cellulaire suggère un rôle important de ce complexe dans la migration cellulaire.

### **3.5 La MT1-MMP phosphorylée interagit avec p130Cas**

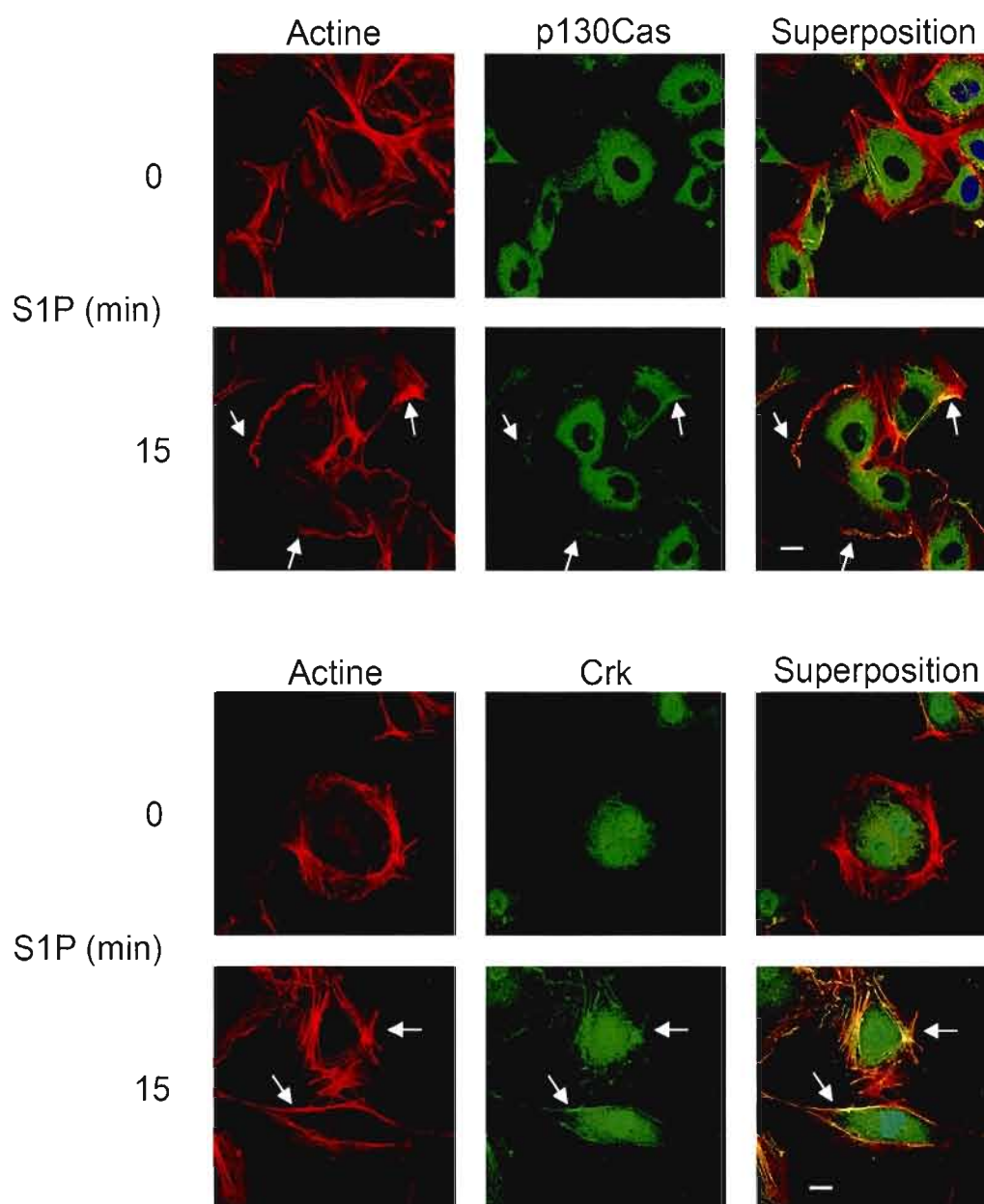
En plus de son effet de stimulation sur la phosphorylation des tyrosines de p130Cas, nous avons récemment montré que la S1P induit également la phosphorylation de la MT1-MMP sur son unique résidu tyrosine localisé dans sa portion cytoplasmique (Nyalendo *et al.*, 2007). Cette modification de la MT1-MMP semble jouer un rôle important dans la migration des CEs dépendante de la S1P

(Nyalendo *et al.*, 2007), suggérant que le complexe p130Cas/MT1-MMP puisse contenir, au moins en partie, la forme phosphorylée de l'enzyme. Nous avons donc voulu observer si cette phosphorylation jouait un rôle important dans l'interaction entre la MT1-MMP et p130Cas. En utilisant les anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007), nous avons observé que la phosphorylation de la tyrosine de la MT1-MMP dépendante de la S1P corrèle avec l'association de l'enzyme avec p130Cas phosphorylée (Figure 3.10). Bien que les anticorps spécifiques à la forme phosphorylée de la MT1-MMP soient inadéquats pour immunoprécipiter l'enzyme et ne peuvent être utilisés directement afin d'observer son association avec pp130Cas, l'immunoprécipitation de lysats cellulaires en utilisant des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de p130Cas a révélé la présence de pMT1-MMP dans les complexes immuns, indiquant de nouveau une interaction de p130Cas et MT1-MMP phosphorylée.

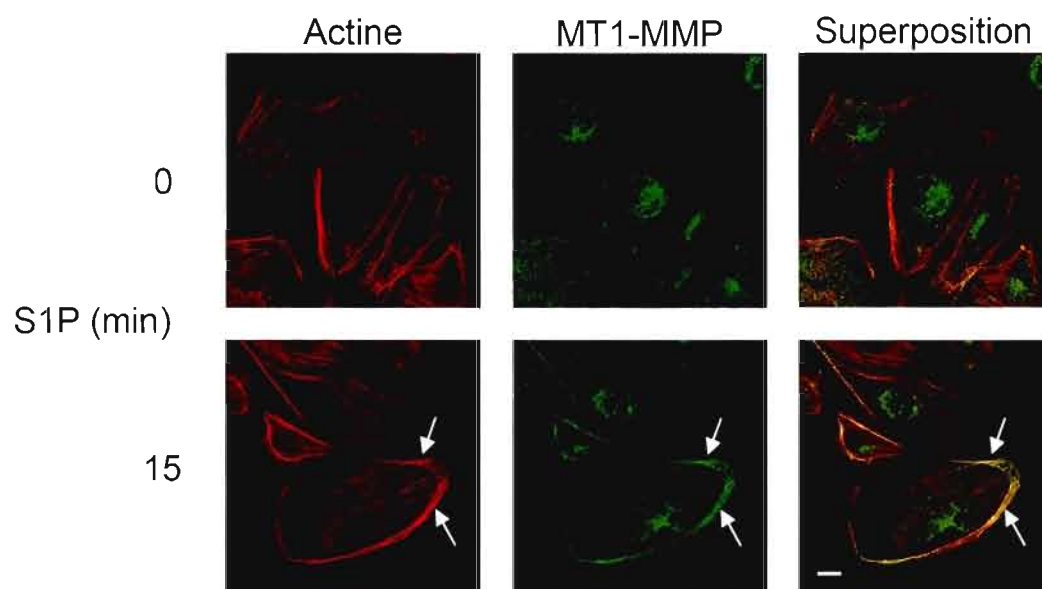
Au niveau cellulaire, une caractéristique frappante du complexe pMT1-MMP/p130Cas est sa polarisation au front de migration des CEs (Figure 3.11) d'une façon très similaire à celle observée en utilisant les anticorps qui reconnaissent l'association de MT1-MMP avec p130Cas (Figure 3.5) ou pp130Cas (Figure 3.11, résultats du haut). Dans de nombreuses expériences, cette colocalisation de pMT1-MMP et p130Cas dans les protrusions cellulaires est grandement augmentée lors de la stimulation à la S1P (Figure 3.11, résultats du bas), supportant une forte interaction entre ces protéines. En effet, nous apercevons sur la figure 3.11, en plus du transfert, une colocalisation (en jaune) de la MT1-MMP avec pp130Cas ainsi qu'une colocalisation de p130Cas avec la pMT1-MMP, toutes deux observées à la périphérie membranaire des HUVECs, à la suite d'une stimulation à la S1P de 15 minutes. Globalement, ces résultats suggèrent que la formation du complexe MT1-MMP/p130Cas implique la phosphorylation des tyrosines de ces deux protéines et que la formation de ce complexe pourrait participer dans les voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire.



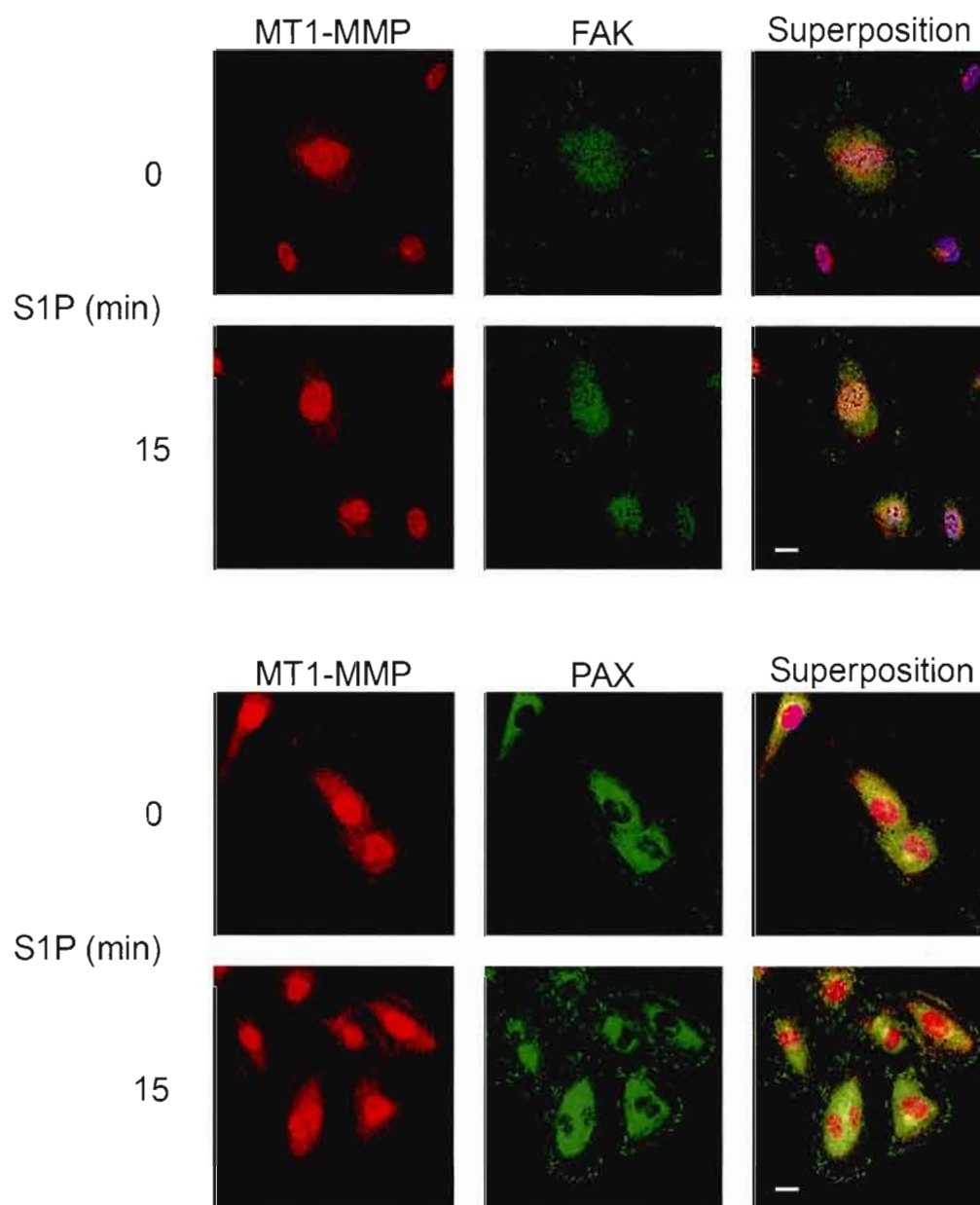
**Figure 3.1 : Interaction entre p130Cas et Crk dans les HUVECs.** Les cellules ont été sevrées 18 h et ont été stimulées par la S1P (1  $\mu$ M) pendant 1, 5, 15 ou 30 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre p130Cas ou Crk ont été ajoutés toute la nuit à 4°C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines G pour 2 h. La présence de p130Cas et Crk dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



**Figure 3.2 : La S1P induit la relocalisation de p130Cas et Crk à la périphérie cellulaire.** Les HUVECs ont été sevrées toute la nuit dans un milieu contenant 1 % de sérum fœtal bovin. Après stimulation avec la S1P (1  $\mu$ M), les cellules ont été traitées tel que mentionné dans la section matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

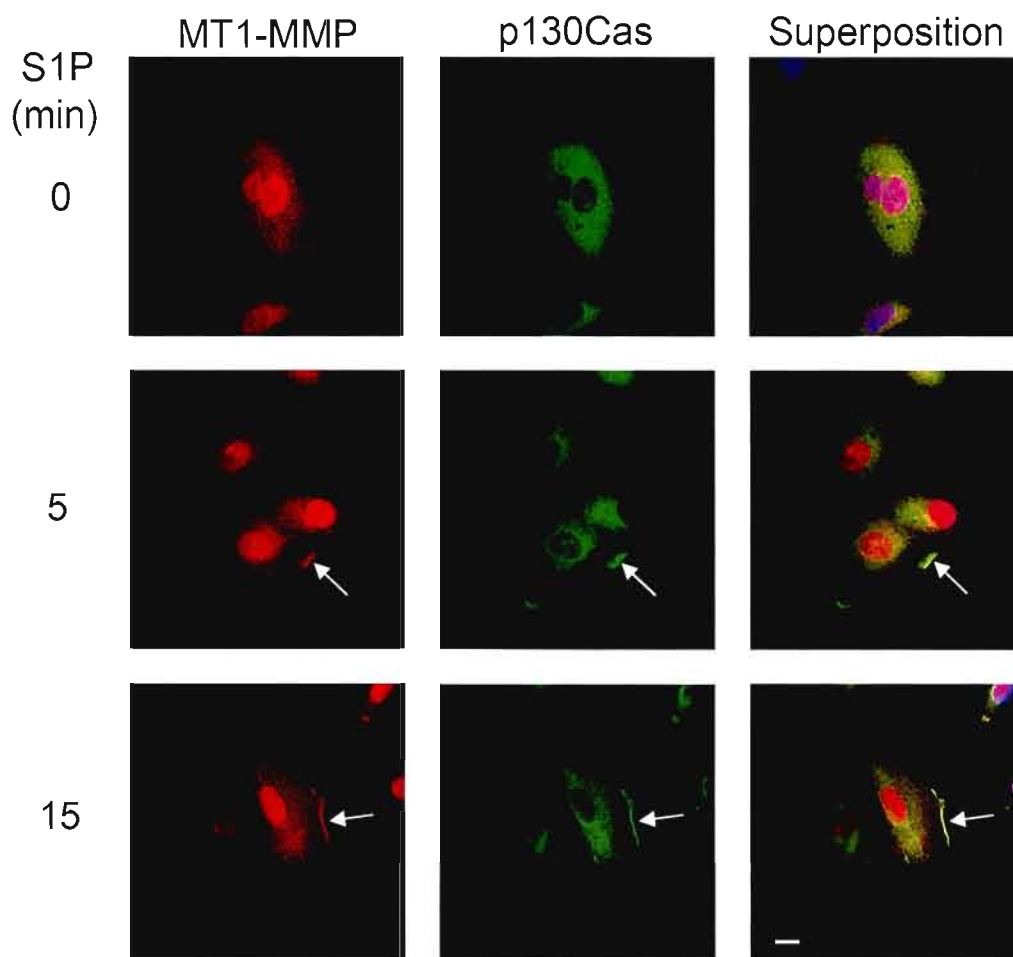


**Figure 3.3 : La S1P induit la relocalisation de la MT1-MMP à la périphérie cellulaire.** Les HUVECs ont été sevrées toute la nuit dans un milieu contenant 1 % de sérum fœtal bovin. Après stimulation avec la S1P (1  $\mu$ M), les cellules ont été traitées tel que mentionné dans la section matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.



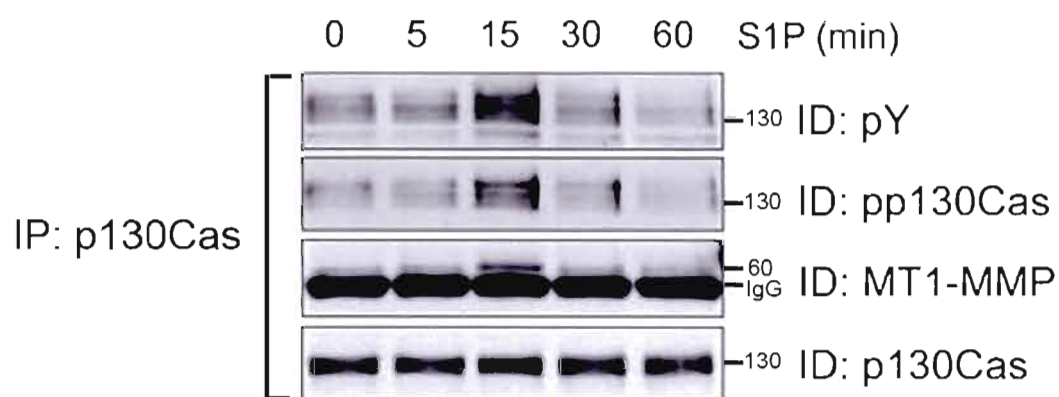
**Figure 3.4 : La MT1-MMP n'est pas associée aux complexes d'adhésion focale.**

Les HUVECs ont été sevrées toute la nuit dans un milieu contenant 1 % de sérum fœtal bovin. Après stimulation avec la S1P (1  $\mu$ M), les cellules ont été traitées tel que mentionné dans la section matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

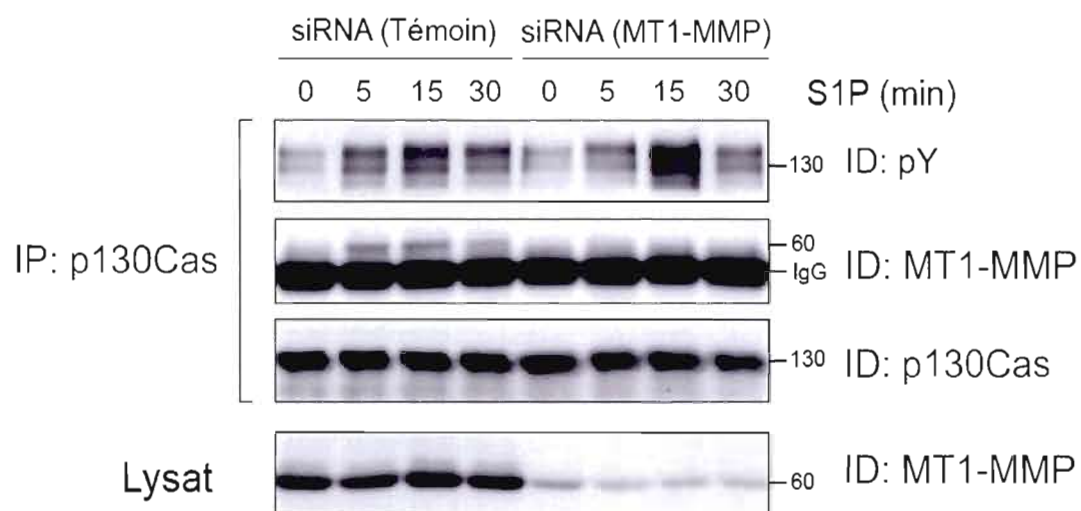


**Figure 3.5 : La S1P induit la colocalisation de la MT1-MMP et p130Cas à la périphérie cellulaire des HUVECs.** Les cellules ont été sevrées toute la nuit dans un milieu contenant 1 % de sérum fœtal bovin. Après stimulation avec la S1P (1  $\mu$ M), les cellules ont été traitées tel que mentionné dans la section matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

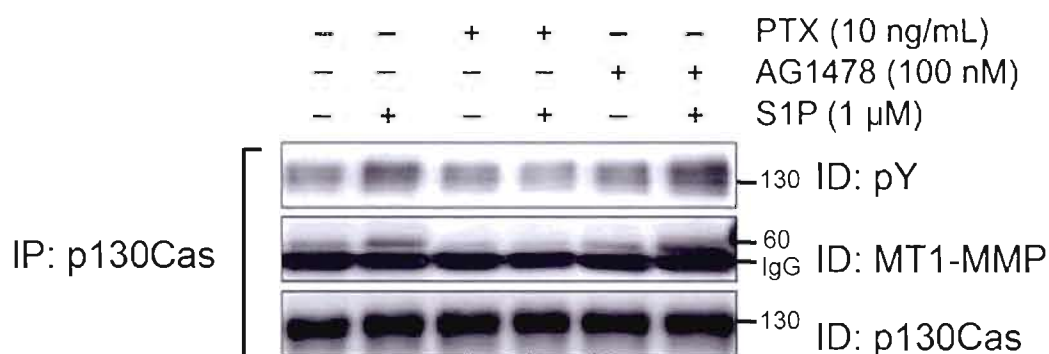




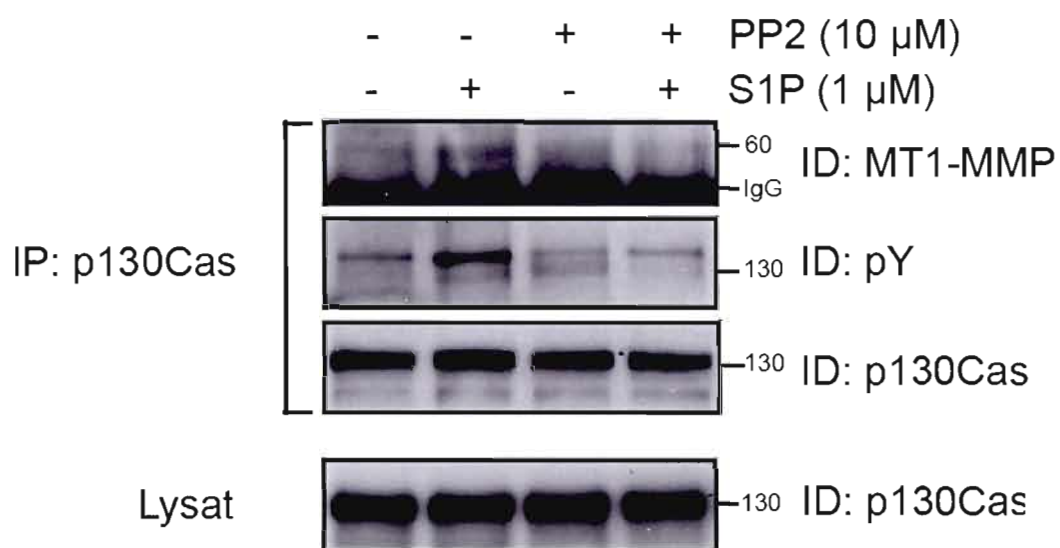
**Figure 3.6 : La S1P induit l'interaction de la MT1-MMP et de p130Cas dans les HUVECs.** Les cellules ont été sevrées 18 h et ont été stimulées à la S1P (1  $\mu$ M) pendant 5, 15, 30 ou 60 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre p130Cas ont été ajoutés toute la nuit à 4 °C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines G pour 2 h. La présence de la MT1-MMP et de p130Cas dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



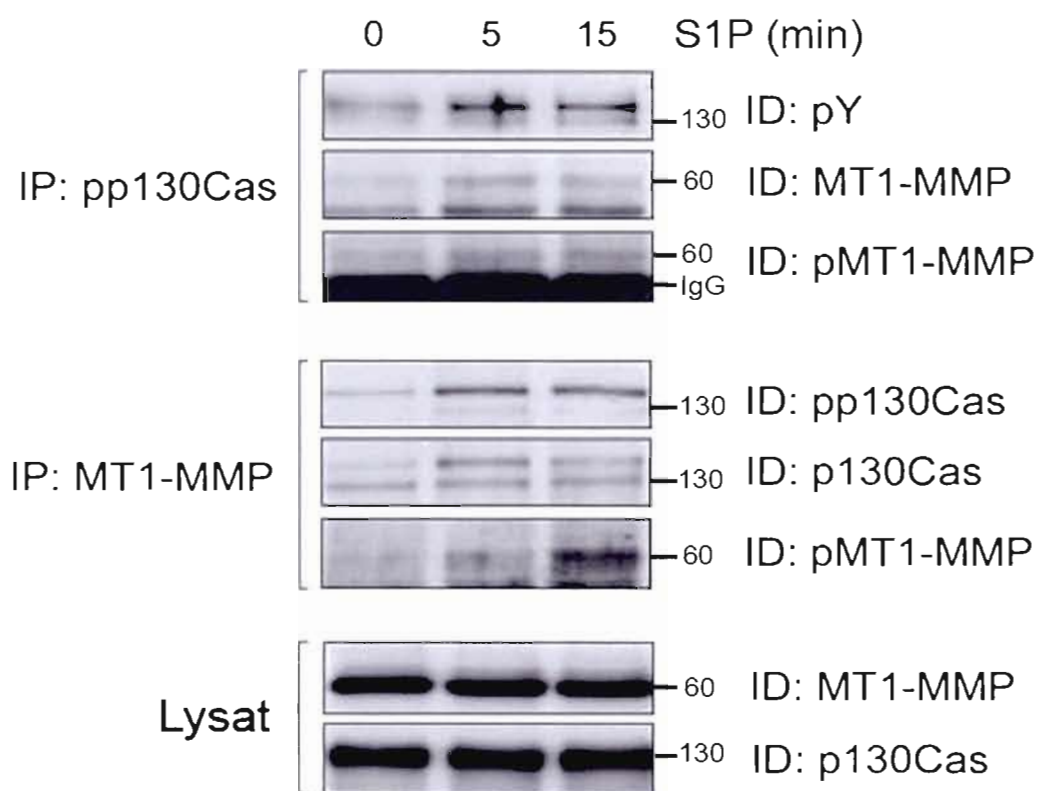
**Figure 3.7 Le siRNA de la MT1-MMP inhibe l'interaction entre la MT1-MMP et p130Cas dans les HUVECs.** Les cellules ont été transfectées avec le siRNA témoin ou avec le siRNA dirigé contre le gène de la MT1-MMP (100 nM) et stimulées avec la S1P (1  $\mu$ M) pendant 5, 15 ou 30 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre p130Cas ont été ajoutés toute la nuit à 4°C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines G pour 2 h. La présence de la MT1-MMP et p130Cas dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



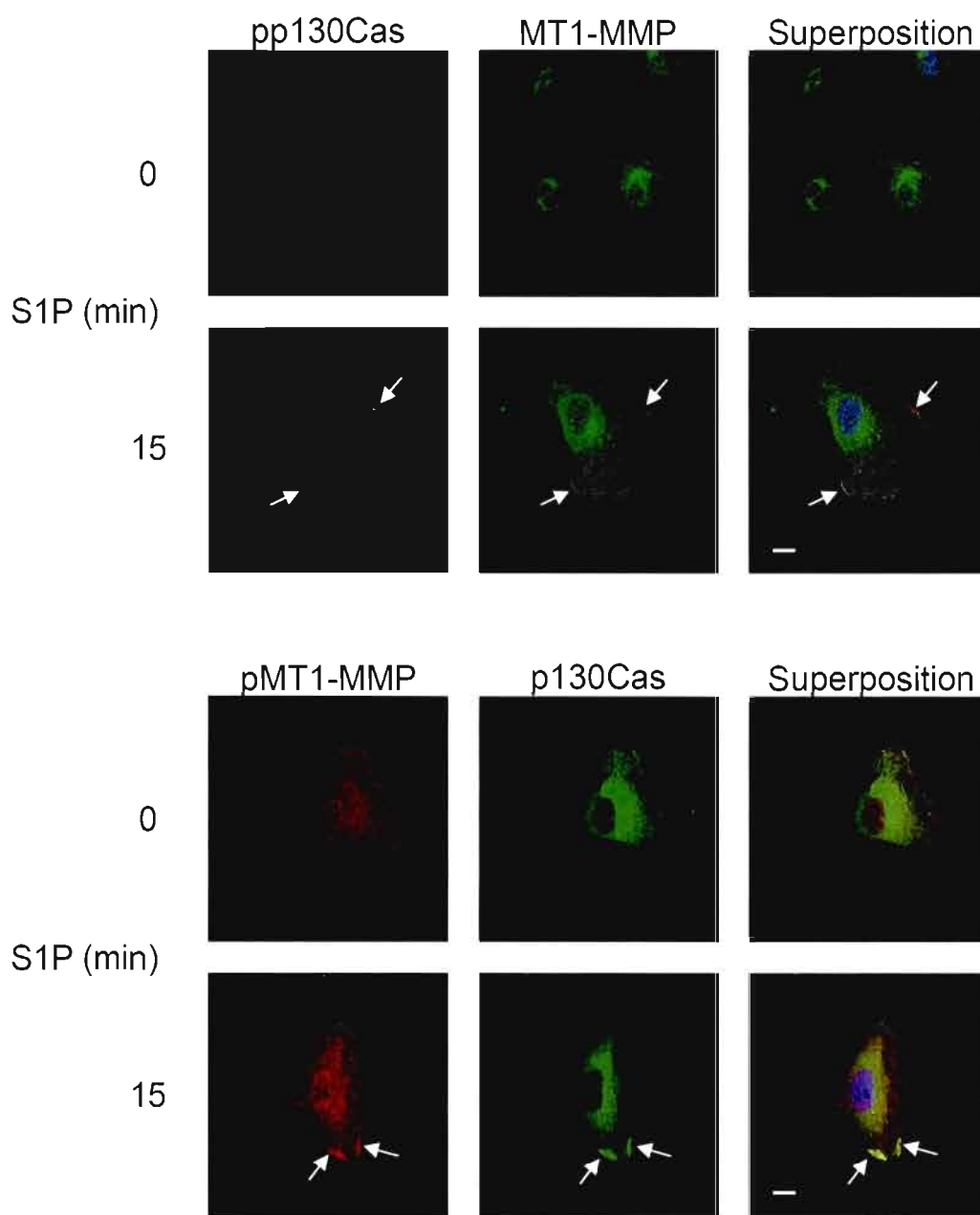
**Figure 3.8 : La toxine pertussique inhibe la phosphorylation de p130Cas et son association avec la MT1-MMP.** Les HUVECs ont été sevrées 18 h et ont été traitées pendant 6 h à la PTX (10 ng/mL) ou pendant 2 h au AG1478 (100 nM). Ensuite, les cellules ont été stimulées par la S1P (1  $\mu$ M) pendant 15 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre p130Cas ont été ajoutés toute la nuit à 4°C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines G pour 2 h. La présence de la MT1-MMP et p130Cas dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



**Figure 3.9 : PP2 inhibe la phosphorylation de p130Cas et son association avec la MT1-MMP.** Les HUVECs ont été sevrées 18 h et ont été traitées au PP2 (10  $\mu$ M) durant 2 h. Ensuite, les cellules ont été stimulées par la S1P (1  $\mu$ M) pendant 15 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre p130Cas ont été ajoutés toute la nuit à 4°C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines G pour 2 h. La présence de la MT1-MMP et p130Cas dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



**Figure 3.10 : La S1P induit la phosphorylation des protéines MT1-MMP et p130Cas dans les HUVECs.** Les cellules ont été sevrées 18 h et ont été stimulées par la S1P (1  $\mu$ M) pendant 5 ou 15 min. Après la lyse des cellules, les anticorps dirigés contre la MT1-MMP ou pp130Cas ont été ajoutés toute la nuit à 4 °C, suivi de l'ajout de billes de sépharose couplées aux protéines A ou G pour 2 h. La présence de la MT1-MMP, pMT1-MMP, pp130Cas et p130Cas dans les complexes immuns a été déterminée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.



**Figure 3.11 : La S1P induit la colocalisation de la MT1-MMP et p130Cas sous forme phosphorylée à la périphérie cellulaire.** Les HUVECs ont été sevrées toute la nuit dans un milieu contenant 1 % de sérum fœtal bovin. Après stimulation avec la S1P (1  $\mu$ M), les cellules ont été traitées tel que mentionné dans la section matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Il est bien connu aujourd'hui que la migration cellulaire est un processus indispensable à l'angiogenèse (Folkman et Shing, 1992). Elle requiert une réorganisation continue du cytosquelette d'actine à l'intérieur des cellules tout en coordonnant l'action de plusieurs récepteurs de la MEC et d'enzymes dégradant la MEC, incluant les membres de la famille des MMPs (Lauffenburger et Horwitz, 1996; Mitchison et Cramer, 1996; Ellis et Murphy, 2001). Il est également connu que lorsque les cellules sont stimulées et qu'elles migrent, la MT1-MMP est relocalisée dans les lamellipodes (Galvez *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1997) et une localisation polarisée semble particulièrement utile afin que les cellules envahissent les tissus (Mori *et al.*, 2002). De plus, des études ont montré que la protéine adaptatrice p130Cas est aussi concentrée dans les replis membranaires des CEs et que cette localisation aurait un rôle important lors de la migration cellulaire (Cheresh, Leng et Klemke, 1999; Klemke *et al.*, 1998).

#### **4.1 L'implication du complexe MT1-MMP/p130Cas dans la migration cellulaire**

Dans cette étude, nous montrons que la stimulation des CEs avec la S1P induit des changements majeurs dans la localisation cellulaire de la MT1-MMP, menant à son association avec la protéine adaptatrice p130Cas au front principal de migration des cellules. De plus, la formation du complexe MT1-MMP/p130Cas requiert la phosphorylation des tyrosines de p130Cas contenues dans son domaine substrat,

tel que révélé par microscopie confocale en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les tyrosines phosphorylées de p130Cas ainsi que par la co-immunoprécipitation de ces deux protéines provenant de lysats cellulaires stimulés à la S1P.

Par contre, il reste à déterminer si la liaison de la MT1-MMP avec p130Cas phosphorylée a lieu avec son domaine Src homology 2 (SH2) ou son domaine SH3, qui facilite l'interaction avec les tyrosines kinases ou les protéines ayant des tyrosines phosphorylées. En effet, p130Cas possède de nombreux domaines permettant des interactions protéine protéine, incluant un domaine SH3 (PXXP) et 15 sites potentiels de liaison avec SH2 (pYXX(I/L)) dans son domaine substrat riche en prolines, soulignant son rôle important comme protéine d'échafaudage impliquée dans des processus de transduction (Defilippi, Di Stefano et Cabodi, 2006; O'Neill, Fashena et Golemis, 2000). En effet, plusieurs protéines ont été identifiées comme partenaire interactif de p130Cas incluant FAK, la famille des kinases Src, Crk et la phosphatase PTP1B. Ce réseau de protéines participe à la transduction de signaux provenant des intégrines et des récepteurs de facteur de croissance à la surface cellulaire (O'Neill, Fashena et Golemis, 2000). De plus, même si des études ont montré que p130Cas n'est pas impliquée comme un déterminant critique de la transformation morphologique relié à Src et de la croissance indépendante d'ancrage, elles ont toutefois révélé un rôle majeur pour p130Cas dans la promotion d'un phénotype invasif associé avec l'augmentation de la formation de podosomes (Brabek *et al.*, 2004).

Bien que le mécanisme moléculaire soutenant l'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas reste à être élucidé et implique probablement d'autres protéines, il est alors tentant de spéculer que l'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas pourrait refléter la participation de l'enzyme dans les processus de signaux de transduction impliqués dans le contrôle de la migration cellulaire. Ainsi, l'interaction de la MT1-MMP avec p130Cas phosphorylée est d'un intérêt particulier étant donné qu'il a été



démontré que l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines de p130Cas était nécessaire pour la migration cellulaire, qu'elle soit déclenchée par l'adhésion cellulaire à la MEC médiée par les intégrines ou bien par les facteurs de croissance (Chodniewicz et Klemke, 2004). De plus, il a été montré que p130Cas est principalement localisée dans le cytoplasme dans un état stable et est transloquée à la périphérie cellulaire après une stimulation à la S1P (Ohmori *et al.*, 2001). Puisque l'importance des tyrosines phosphorylées de p130Cas dans la motilité cellulaire provient de sa localisation dans les lamellipodes de cellules migrantes, déclenchant ainsi une réorganisation du cytosquelette d'actine dépendante de Rac nécessaire pour la migration (Cheresh, Leng et Klemke, 1999), la colocalisation de la MT1-MMP avec p130Cas phosphorylée à l'intérieur de ces domaines supporte le rôle important de ce complexe dans la migration des CEs dépendante de la S1P.

#### **4.2 Localisation de la MT1-MMP dans les replis membranaires**

Nos résultats concordent avec un bon nombre d'études montrant que la MT1-MMP est dirigée vers les lamellipodes au front de migration cellulaire (Gilles *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 1997) et supportent une localisation de son activité protéolytique dans des zones restreintes à la surface de la cellule impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire (Itoh et Seiki, 2006). L'observation du complexe MT1-MMP/p130Cas suivant la stimulation des CEs par la S1P suggère que la localisation de la MT1-MMP dans les lamellipodes peut également impliquer l'interaction de l'enzyme avec des joueurs clés de signalisation intermédiaires impliqués dans la migration et supporte une coopération de l'enzyme avec les événements de signalisation activés par la S1P, tel que suggéré récemment (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004; Langlois *et al.*, 2007). Ainsi, l'identification de la S1P comme un activateur majeur des fonctions de la métalloprotéase matricielle

de type membranaire-1 (MT1-MMP) dans les CEs représente une nouvelle voie reliant l'hémostase à l'angiogenèse (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004).

### **4.3 Importance de la tyrosine située dans la portion cytoplasmique de la MT1-MMP**

Nous avons précédemment montré que la coopération de la MT1-MMP dans la migration des CEs médiée par la S1P requiert le domaine cytoplasmique de l'enzyme (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004; Langlois *et al.*, 2007), suggérant que les signaux provenant de ce domaine, tel que la liaison à la forme phosphorylée de la cavéoline-1 (Labrecque *et al.*, 2004) ou la phosphorylation dépendante de Src de son unique tyrosine localisée dans ce domaine (Nyalendo *et al.*, 2007), peuvent jouer un rôle important dans ce processus. Bien que la phosphorylation de la MT1-MMP ne semble pas être impliquée dans son interaction avec la phosphocavéoline-1 dans les CEs stimulées à la S1P (Nyalendo *et al.*, 2007), les résultats de notre étude montrent que la grande majorité des MT1-MMPs phosphorylées colocalisent avec p130Cas dans les protrusions cellulaires suivant la stimulation des CEs par la S1P, suggérant fortement un rôle crucial de la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP pour son interaction avec p130Cas. De plus, puisque d'autres MT-MMP possèdent une tyrosine à l'intérieur de leur portion cytoplasmique (Fillmore, VanMeter et Broaddus, 2001), nous pouvons donc spéculer qu'elles pourraient subir les mêmes types de relocalisation.

La S1P provenant des plaquettes sanguines est un puissant chimioattractant pour les CEs et peut jouer un rôle important dans les liens existants entre l'hémostase, l'angiogenèse et la croissance tumorale (English, Garcia et Brindley, 2001). Il est bien connu que la S1P est un lipide actif qui induit la migration des CEs sur une variété de protéines de la MEC (Panetti, 2002) et dans le processus

d'angiogenèse, la migration des cellules endothéliales joue un rôle primordial. Il a été démontré que la présence des récepteurs S1P<sub>1</sub> est essentielle lors de l'angiogenèse tumorale (Chae *et al.*, 2004), ce qui nous permet de spéculer qu'elle le serait également lors de la migration des CEs où le complexe MT1-MMP/p130Cas est relocalisé au front de migration. Durant l'angiogenèse, les CEs doivent surmonter la résistance physique du réseau tridimensionnel de la MEC afin de migrer vers les stimuli chimiotactiques et former de nouveaux vaisseaux (van Hinsbergh, Engelse et Quax, 2006). La colocalisation coordonnée des activités péricellulaires protéolytiques et des signaux intermédiaires impliqués dans la motilité cellulaire à la surface des CEs est connue pour jouer un rôle essentiel pour coordonner la protéolyse et la migration et l'invasion cellulaire. L'identification du complexe MT1-MMP/p130Cas au front principal des CEs migrantes suggère donc l'existence d'un mécanisme efficace par lequel la protéolyse péricellulaire pourrait être reliée à l'activation des voies de signalisation, permettant la migration coordonnée des CEs.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Dans cette étude, nous montrons que la stimulation des CEs avec la S1P induit des changements majeurs dans la localisation cellulaire de la MT1-MMP, menant à son association avec la protéine adaptatrice p130Cas au front principal de migration des CEs. De plus, nos résultats démontrent que ce complexe est localisé dans les lamellipodes du front de migration cellulaire et supportent une régulation spatiotemporelle de son activité protéolytique dans des zones restreintes à la surface de la cellule impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire. Ainsi, l'identification du complexe MT1-MMP/p130Cas au front principal des CEs migrantes suggère un mécanisme efficace par lequel la protéolyse péricellulaire est reliée avec l'activation des voies de signalisation, permettant la migration coordonnée des CEs. L'identification des protéines qui lient spécifiquement la forme phosphorylée de la MT1-MMP devrait permettre d'obtenir des informations intéressantes sur le mécanisme impliqué dans la formation du complexe MT1-MMP/p130Cas et de sa localisation au front principal des cellules migratrices. De plus, il serait très intéressant de vérifier ce mécanisme dans un modèle de cellule endothéliale cérébrale, d'observer quels sont les récepteurs EDG impliqués, l'importance des autres facteurs plaquettaires (LPA) et de voir si les autres MT-MMP (2 à 6) pourraient également subir les mêmes types de relocalisation membranaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2005. «Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG». *J Neurochem.* vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., A. Pilorget, N. Bousquet-Gagnon, D. Gingras et R. Beliveau. 2001. «Calmodulin inhibitors trigger the proteolytic processing of membrane type-1 matrix metalloproteinase, but not its shedding in glioblastoma cells». *Biochem J.* vol. 359, no Pt 2, p. 325-333.
- Belien, A. T., P. A. Paganetti et M. E. Schwab. 1999. «Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter». *J Cell Biol.* vol. 144, no 2, p. 373-384.
- Béliveau, R., et D. Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer: la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation*, Éditions du Trécarré. Outremont, 213 p.
- Belkin, A. M., S. S. Akimov, L. S. Zaritskaya, B. I. Ratnikov, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin. 2001. «Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion». *J Biol Chem.* vol. 276, no 21, p. 18415-18422.
- Bigg, H. F., C. J. Morrison, G. S. Butler, M. A. Bogoyevitch, Z. Wang, P. D. Soloway et C. M. Overall. 2001. «Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase». *Cancer Res.* vol. 61, no 9, p. 3610-3618.
- Boccaccio, C., et P. M. Comoglio. 2005. «A functional role for hemostasis in early cancer development». *Cancer Res.* vol. 65, no 19, p. 8579-8582.
- Brabek, J., S. S. Constancio, N. Y. Shin, A. Pozzi, A. M. Weaver et S. K. Hanks. 2004. «CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells». *Oncogene.* vol. 23, no 44, p. 7406-7415.
- Brinckerhoff, C. E., et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 3, no 3, p. 207-214.

- Burnham, M. R., P. J. Bruce-Staskal, M. T. Harte, C. L. Weidow, A. Ma, S. A. Weed et A. H. Bouton. 2000. «Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS». *Mol Cell Biol.* vol. 20, no 16, p. 5865-5878.
- Cabodi, S., L. Moro, G. Baj, M. Smeriglio, P. Di Stefano, S. Gippone, N. Surico, L. Silengo, E. Turco, G. Tarone et P. Defilippi. 2004. «p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells». *J Cell Sci.* vol. 117, no Pt 8, p. 1603-1611.
- Casamassima, A., et E. Rozengurt. 1997. «Tyrosine phosphorylation of p130(cas) by bombesin, lysophosphatidic acid, phorbol esters, and platelet-derived growth factor. Signaling pathways and formation of a p130(cas)-Crk complex». *J Biol Chem.* vol. 272, no 14, p. 9363-9370.
- Chae, S. S., J. H. Paik, H. Furneaux et T. Hla. 2004. «Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference». *J Clin Invest.* vol. 114, no 8, p. 1082-1089.
- Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal et T. Chakraborti. 2003. «Regulation of matrix metalloproteinases: an overview». *Mol Cell Biochem.* vol. 253, no 1-2, p. 269-285.
- Chang, C., et Z. Werb. 2001. «The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis». *Trends Cell Biol.* vol. 11, no 11, p. S37-43.
- Cheresh, D. A., J. Leng et R. L. Klemke. 1999. «Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells». *J Cell Biol.* vol. 146, no 5, p. 1107-1116.
- Cho, S. Y., et R. L. Klemke. 2000. «Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix». *J Cell Biol.* vol. 149, no 1, p. 223-236.
- Cho, S. Y., et R. L. Klemke. 2002. «Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold». *J Cell Biol.* vol. 156, no 4, p. 725-736.
- Chodniewicz, D., et R. L. Klemke. 2004. «Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1692, no 2-3, p. 63-76.
- Cote, J. F., et K. Vuori. 2002. «Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity». *J Cell Sci.* vol. 115, no Pt 24, p. 4901-4913.

- d'Ortho, M. P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi et G. Murphy. 1997. «Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases». *Eur J Biochem.* vol. 250, no 3, p. 751-757.
- Defilippi, P., P. Di Stefano et S. Cabodi. 2006. «p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks». *Trends Cell Biol.* vol. 16, no 5, p. 257-263.
- Denekamp, J. 1984. «Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours». *Acta Radiol Oncol.* vol. 23, no 4, p. 217-225.
- Deryugina, E. I., B. I. Ratnikov, T. I. Postnova, D. V. Rozanov et A. Y. Strongin. 2002. «Processing of integrin  $\alpha(v)$  subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase». *J Biol Chem.* vol. 277, no 12, p. 9749-9756.
- Deryugina, E. I., A. Zijlstra, J. J. Partridge, T. A. Kupriyanova, M. A. Madsen, T. Papagiannakopoulos et J. P. Quigley. 2005. «Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination». *Cancer Res.* vol. 65, no 23, p. 10959-10969.
- Egeblad, M., et Z. Werb. 2002. «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nat Rev Cancer.* vol. 2, no 3, p. 161-174.
- Ellis, V., et G. Murphy. 2001. «Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion». *FEBS Lett.* vol. 506, no 1, p. 1-5.
- Endo, A., K. Nagashima, H. Kurose, S. Mochizuki, M. Matsuda et N. Mochizuki. 2002. «Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and Crkl». *J Biol Chem.* vol. 277, no 26, p. 23747-23754.
- Endo, K., T. Takino, H. Miyamori, H. Kinsen, T. Yoshizaki, M. Furukawa et H. Sato. 2003. «Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration». *J Biol Chem.* vol. 278, no 42, p. 40764-40770.
- Engelse, M. A., R. Hanemaaijer, P. Koolwijk et V. W. van Hinsbergh. 2004. «The fibrinolytic system and matrix metalloproteinases in angiogenesis and tumor progression». *Semin Thromb Hemost.* vol. 30, no 1, p. 71-82.

- English, D., D. N. Brindley, S. Spiegel et J. G. Garcia. 2002. «Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1582, no 1-3, p. 228-239.
- English, D., J. G. Garcia et D. N. Brindley. 2001. «Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis». *Cardiovasc Res*. vol. 49, no 3, p. 588-599.
- Fillmore, H. L., T. E. VanMeter et W. C. Broaddus. 2001. «Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion». *J Neurooncol*. vol. 53, no 2, p. 187-202.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *J Biol Chem*. vol. 267, no 16, p. 10931-10934.
- Fonseca, P. M., N. Y. Shin, J. Brabek, L. Ryzhova, J. Wu et S. K. Hanks. 2004. «Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation». *Cell Signal*. vol. 16, no 5, p. 621-629.
- Gainor, J. P., C. A. Morton, D. R. Bell, P. A. Vincent et F. L. Minnear. 2000. «Platelet phospholipids decrease vascular endothelial permeability via a novel signaling pathway independent of cAMP/protein kinase A». *Ann N Y Acad Sci*. vol. 905, p. 315-318.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, J. P. Albar, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo. 2001. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling». *J Biol Chem*. vol. 276, no 40, p. 37491-37500.
- Garcia, J. G., F. Liu, A. D. Verin, A. Birukova, M. A. Dechert, W. T. Gerthoffer, J. R. Bamberg et D. English. 2001. «Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement». *J Clin Invest*. vol. 108, no 5, p. 689-701.
- Gilles, C., M. Polette, C. Coraux, J. M. Tournier, G. Meneguzzi, C. Munaut, L. Volders, P. Rousselle, P. Birembaut et J. M. Foidart. 2001. «Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration». *J Cell Sci*. vol. 114, no Pt 16, p. 2967-2976.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Beliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett*. vol. 507, no 2, p. 231-236.



- Gingras, D., M. Page, B. Annabi et R. Beliveau. 2000. «Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1497, no 3, p. 341-350.
- Goetzl, E. J., et S. An. 1998. «Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate». *FASEB J*. vol. 12, no 15, p. 1589-1598.
- Goetzl, E. J., W. Wang, C. McGiffert, M. C. Huang et M. H. Graler. 2004. «Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system». *J Cell Biochem*. vol. 92, no 6, p. 1104-1114.
- Griffioen, A. W., et G. Molema. 2000. «Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation». *Pharmacol Rev*. vol. 52, no 2, p. 237-268.
- Gustavsson, A., M. Yuan et M. Fallman. 2004. «Temporal dissection of beta1-integrin signaling indicates a role for p130Cas-Crk in filopodia formation». *J Biol Chem*. vol. 279, no 22, p. 22893-22901.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*. vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Hanks, S. K., L. Ryzhova, N. Y. Shin et J. Brabek. 2003. «Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility». *Front Biosci*. vol. 8, p. d982-996.
- Hauck, C. R., D. J. Sieg, D. A. Hsia, J. C. Loftus, W. A. Gaarde, B. P. Monia et D. D. Schlaepfer. 2001. «Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells». *Cancer Res*. vol. 61, no 19, p. 7079-7090.
- Hiraoka, N., E. Allen, I. J. Apel, M. R. Gyetko et S. J. Weiss. 1998. «Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins». *Cell*. vol. 95, no 3, p. 365-377.
- Hla, T., M. J. Lee, N. Ancellin, C. H. Liu, S. Thangada, B. D. Thompson et M. Kluk. 1999. «Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger?». *Biochem Pharmacol*. vol. 58, no 2, p. 201-207.
- Holmbeck, K., P. Bianco, S. Yamada et H. Birkedal-Hansen. 2004. «MT1-MMP: a tethered collagenase». *J Cell Physiol*. vol. 200, no 1, p. 11-19.

- Honda, H., H. Oda, T. Nakamoto, Z. Honda, R. Sakai, T. Suzuki, T. Saito, K. Nakamura, K. Nakao, T. Ishikawa, M. Katsuki, Y. Yazaki et H. Hirai. 1998. «Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas». *Nat Genet.* vol. 19, no 4, p. 361-365.
- Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana et S. J. Weiss. 2000. «Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3». *J Cell Biol.* vol. 149, no 6, p. 1309-1323.
- Hotary, K. B., E. D. Allen, P. C. Brooks, N. S. Datta, M. W. Long et S. J. Weiss. 2003. «Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix». *Cell.* vol. 114, no 1, p. 33-45.
- Hsia, D. A., S. K. Mitra, C. R. Hauck, D. N. Streblow, J. A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G. R. Nemerow, J. Leng, K. S. Spencer, D. A. Cheresch et D. D. Schlaepfer. 2003. «Differential regulation of cell motility and invasion by FAK». *J Cell Biol.* vol. 160, no 5, p. 753-767.
- Itoh, Y., et H. Nagase. 2002. «Matrix metalloproteinases in cancer». *Essays Biochem.* vol. 38, p. 21-36.
- Itoh, Y., et M. Seiki. 2004. «MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation». *Trends Biochem Sci.* vol. 29, no 6, p. 285-289.
- Itoh, Y., et M. Seiki. 2006. «MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment». *J Cell Physiol.* vol. 206, no 1, p. 1-8.
- Itoh, Y., A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki et M. Seiki. 2001. «Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion». *EMBO J.* vol. 20, no 17, p. 4782-4793.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S. J. Weiss, J. Keski-Oja et D. Pei. 2001. «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 98, no 24, p. 13693-13698.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh et M. Seiki. 2001. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration». *J Cell Biol.* vol. 153, no 5, p. 893-904.

- Kim, Y. M., J. W. Jang, O. H. Lee, J. Yeon, E. Y. Choi, K. W. Kim, S. T. Lee et Y. G. Kwon. 2000. «Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase». *Cancer Res.* vol. 60, no 19, p. 5410-5413.
- Kimura, T., T. Watanabe, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, K. Tamama, A. Kuwabara, T. Kanda, I. Kobayashi, H. Ohta, M. Ui et F. Okajima. 2000. «Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3». *Biochem J.* vol. 348 Pt 1, p. 71-76.
- Klemke, R. L., J. Leng, R. Molander, P. C. Brooks, K. Vuori et D. A. Cheresh. 1998. «CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration». *J Cell Biol.* vol. 140, no 4, p. 961-972.
- Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, J. A. Cooper et P. Soriano. 1999. «Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction». *EMBO J.* vol. 18, no 9, p. 2459-2471.
- Kluk, M. J., et T. Hla. 2002. «Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1582, no 1-3, p. 72-80.
- Knauper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembray et G. Murphy. 1996. «Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme». *J Biol Chem.* vol. 271, no 29, p. 17124-17131.
- Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki et V. Quaranta. 2000. «Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5». *J Cell Biol.* vol. 148, no 3, p. 615-624.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2004. «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem.* vol. 279, no 50, p. 52132-52140.
- Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Exp Cell Res.* vol. 307, no 2, p. 452-464.

- Langlois, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2004. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation». *Blood*. vol. 103, no 8, p. 3020-3028.
- Langlois, S., C. Nyalendo, G. Di Tomasso, L. Labrecque, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation». *Mol Cancer Res*. vol. 5, no 6, p. 569-583.
- Lauffenburger, D. A., et A. F. Horwitz. 1996. «Cell migration: a physically integrated molecular process». *Cell*. vol. 84, no 3, p. 359-369.
- Lee, A. Y. 2002. «Cancer and thromboembolic disease: pathogenic mechanisms». *Cancer Treat Rev*. vol. 28, no 3, p. 137-140.
- Lee, M. J., S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha'afi et T. Hla. 1999a. «Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate». *Cell*. vol. 99, no 3, p. 301-312.
- Lee, O. H., D. J. Lee, Y. M. Kim, Y. S. Kim, H. J. Kwon, K. W. Kim et Y. G. Kwon. 2000b. «Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and chemotactic motility of endothelial cells via the G(i) protein-linked phospholipase C pathway». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 268, no 1, p. 47-53.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen et J. Keski-Oja. 1998. «Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface». *Biochem J*. vol. 334 ( Pt 2), p. 345-353.
- Lehti, K., H. Valtanen, S. A. Wickstrom, J. Lohi et J. Keski-Oja. 2000. «Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain». *J Biol Chem*. vol. 275, no 20, p. 15006-15013.
- Li, Y., T. Aoki, Y. Mori, M. Ahmad, H. Miyamori, T. Takino et H. Sato. 2004. «Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar». *Cancer Res*. vol. 64, no 19, p. 7058-7064.
- Liu, F., A. D. Verin, P. Wang, R. Day, R. P. Wersto, F. J. Chrest, D. K. English et J. G. Garcia. 2001. «Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(alpha2)-linked Rho kinase activity». *Am J Respir Cell Mol Biol*. vol. 24, no 6, p. 711-719.

- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel et R. L. Proia. 2000. «Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation». *J Clin Invest.* vol. 106, no 8, p. 951-961.
- Matsumoto, T., et L. Claesson-Welsh. 2001. «VEGF receptor signal transduction». *Sci STKE.* vol. 2001, no 112, p. RE21.
- Mazzone, M., M. Baldassarre, G. Beznoussenko, G. Giacchetti, J. Cao, S. Zucker, A. Luini et R. Buccione. 2004. «Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains». *J Cell Sci.* vol. 117, no Pt 26, p. 6275-6287.
- McVerry, B. J., et J. G. Garcia. 2004. «Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate». *J Cell Biochem.* vol. 92, no 6, p. 1075-1085.
- McVerry, B. J., et J. G. Garcia. 2005. «In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights». *Cell Signal.* vol. 17, no 2, p. 131-139.
- Mignatti, P., et D. B. Rifkin. 1996. «Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis». *Enzyme Protein.* vol. 49, no 1-3, p. 117-137.
- Mitchison, T. J., et L. P. Cramer. 1996. «Actin-based cell motility and cell locomotion». *Cell.* vol. 84, no 3, p. 371-379.
- Mitra, S. K., D. A. Hanson et D. D. Schlaepfer. 2005. «Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 6, no 1, p. 56-68.
- Moolenaar, W. H. 1999. «Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors». *Exp Cell Res.* vol. 253, no 1, p. 230-238.
- Mori, H., T. Tomari, N. Koshikawa, M. Kajita, Y. Itoh, H. Sato, H. Tojo, I. Yana et M. Seiki. 2002. «CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain». *EMBO J.* vol. 21, no 15, p. 3949-3959.
- Nagase, H., et J. F. Woessner, Jr. 1999. «Matrix metalloproteinases». *J Biol Chem.* vol. 274, no 31, p. 21491-21494.
- Nakahara, H., L. Howard, E. W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh et W. T. Chen. 1997. «Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 94, no 15, p. 7959-7964.

- Nakamoto, T., R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki et H. Hirai. 1997. «Requirements for localization of p130cas to focal adhesions». *Mol Cell Biol.* vol. 17, no 7, p. 3884-3897.
- Nakamoto, T., R. Sakai, K. Ozawa, Y. Yazaki et H. Hirai. 1996. «Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase». *J Biol Chem.* vol. 271, no 15, p. 8959-8965.
- Nash, G. F., D. C. Walsh et A. K. Kakkar. 2001. «The role of the coagulation system in tumour angiogenesis». *Lancet Oncol.* vol. 2, no 10, p. 608-613.
- Needham, L. K., et E. Rozengurt. 1998. «Galpha12 and Galpha13 stimulate Rho-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130 Crk-associated substrate». *J Biol Chem.* vol. 273, no 23, p. 14626-14632.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type 1 matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem.* vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- O'Neill, G. M., S. J. Fashena et E. A. Golemis. 2000. «Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage». *Trends Cell Biol.* vol. 10, no 3, p. 111-119.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi et M. Noda. 2001. «The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis». *Cell.* vol. 107, no 6, p. 789-800.
- Ohmori, T., Y. Yatomi, H. Okamoto, Y. Miura, G. Rile, K. Satoh et Y. Ozaki. 2001. «G(i)-mediated Cas tyrosine phosphorylation in vascular endothelial cells stimulated with sphingosine 1-phosphate: possible involvement in cell motility enhancement in cooperation with Rho-mediated pathways». *J Biol Chem.* vol. 276, no 7, p. 5274-5280.
- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1997. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules». *J Biol Chem.* vol. 272, no 4, p. 2446-2451.
- Okuda, M., M. Takahashi, J. Suero, C. E. Murry, O. Traub, H. Kawakatsu et B. C. Berk. 1999. «Shear stress stimulation of p130(cas) tyrosine phosphorylation requires calcium-dependent c-Src activation». *J Biol Chem.* vol. 274, no 38, p. 26803-26809.

- Organisation mondiale de la santé. 2005. «Action mondiale contre le cancer». Suisse: 15 p.
- Osenkowski, P., M. Toth et R. Fridman. 2004. «Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Cell Physiol.* vol. 200, no 1, p. 2-10.
- Paik, J. H., Ss Chae, M. J. Lee, S. Thangada et T. Hla. 2001. «Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins». *J Biol Chem.* vol. 276, no 15, p. 11830-11837.
- Panetti, T. S. 2002. «Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1582, no 1-3, p. 190-196.
- Panetti, T. S., J. Nowlen et D. F. Mosher. 2000. «Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 20, no 4, p. 1013-1019.
- Parsons, J. T. 2003. «Focal adhesion kinase: the first ten years». *J Cell Sci.* vol. 116, no Pt 8, p. 1409-1416.
- Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor et S. A. Weed. 2000. «Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement». *Oncogene.* vol. 19, no 49, p. 5606-5613.
- Payne, S. G., S. Milstien et S. Spiegel. 2002. «Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions». *FEBS Lett.* vol. 531, no 1, p. 54-57.
- Pei, D., et S. J. Weiss. 1996. «Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity». *J Biol Chem.* vol. 271, no 15, p. 9135-9140.
- Pepper, M. S. 2001. «Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 21, no 7, p. 1104-1117.
- Pinedo, H. M., H. M. Verheul, R. J. D'Amato et J. Folkman. 1998. «Involvement of platelets in tumour angiogenesis?». *Lancet.* vol. 352, no 9142, p. 1775-1777.
- Pirie-Shepherd, S. R. 2003. «Regulation of angiogenesis by the hemostatic system». *Front Biosci.* vol. 8, p. d286-293.



- Remacle, A., G. Murphy et C. Roghi. 2003. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface». *J Cell Sci.* vol. 116, no Pt 19, p. 3905-3916.
- Rozanov, D. V., E. I. Deryugina, B. I. Ratnikov, E. Z. Monosov, G. N. Marchenko, J. P. Quigley et A. Y. Strongin. 2001. «Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells». *J Biol Chem.* vol. 276, no 28, p. 25705-25714.
- Rozengurt, E. 1998. «V. Gastrointestinal peptide signaling through tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins». *Am J Physiol.* vol. 275, no 2 Pt 1, p. G177-182.
- Ruest, P. J., N. Y. Shin, T. R. Polte, X. Zhang et S. K. Hanks. 2001. «Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src». *Mol Cell Biol.* vol. 21, no 22, p. 7641-7652.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki et H. Hirai. 1994. «A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner». *EMBO J.* vol. 13, no 16, p. 3748-3756.
- Sakai, R., T. Nakamoto, K. Ozawa, S. Aizawa et H. Hirai. 1997. «Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130Cas in fibroblasts». *Oncogene.* vol. 14, no 12, p. 1419-1426.
- Sanz, L., et L. Alvarez-Vallina. 2003. «The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies». *Trends Mol Med.* vol. 9, no 6, p. 256-262.
- Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama et M. Seiki. 1996. «Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2». *FEBS Lett.* vol. 393, no 1, p. 101-104.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto et M. Seiki. 1994. «A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells». *Nature.* vol. 370, no 6484, p. 61-65.
- Sato, T., M. del Carmen Ovejero, P. Hou, A. M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged et J. M. Delaisse. 1997. «Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts». *J Cell Sci.* vol. 110 ( Pt 5), p. 589-596.



- Sayeski, P. P., M. S. Ali, J. B. Harp, M. B. Marrero et K. E. Bernstein. 1998. «Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C». *Circ Res.* vol. 82, no 12, p. 1279-1288.
- Schlaepfer, D. D., et T. Hunter. 1998. «Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?». *Trends Cell Biol.* vol. 8, no 4, p. 151-157.
- Seiki, M. 1999. «Membrane-type matrix metalloproteinases». *APMIS.* vol. 107, no 1, p. 137-143.
- Seiki, M. 2002. «The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 14, no 5, p. 624-632.
- Seiki, M. 2003a. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion». *Cancer Lett.* vol. 194, no 1, p. 1-11.
- Seiki, M., et I. Yana. 2003b. «Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis». *Cancer Sci.* vol. 94, no 7, p. 569-574.
- Sivakumar, B., L. E. Harry et E. M. Paleolog. 2004. «Modulating angiogenesis: more vs less». *JAMA.* vol. 292, no 8, p. 972-977.
- Société canadienne du cancer, l'Institut national du cancer du Canada, Statistique Canada et l'Agence de santé publique du Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer 2007, Toronto: 124 p.
- Sounni, N. E., M. Janssen, J. M. Foidart et A. Noel. 2003. «Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis». *Matrix Biol.* vol. 22, no 1, p. 55-61.
- Sounni, N. E., C. Roghi, V. Chabottaux, M. Janssen, C. Munaut, E. Maquoi, B. G. Galvez, C. Gilles, F. Frankenne, G. Murphy, J. M. Foidart et A. Noel. 2004. «Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases». *J Biol Chem.* vol. 279, no 14, p. 13564-13574.
- Spiegel, S. 1999. «Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers». *J Leukoc Biol.* vol. 65, no 3, p. 341-344.
- Spiegel, S., D. English et S. Milstien. 2002. «Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction». *Trends Cell Biol.* vol. 12, no 5, p. 236-242.

- Spiegel, S., et S. Milstien. 2003. «Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 4, no 5, p. 397-407.
- Stanton, H., J. Gavrilovic, S. J. Atkinson, M. P. d'Ortho, K. M. Yamada, L. Zardi et G. Murphy. 1998. «The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form». *J Cell Sci.* vol. 111 ( Pt 18), p. 2789-2798.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg. 1995. «Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease». *J Biol Chem.* vol. 270, no 10, p. 5331-5338.
- Stupack, D. G., et D. A. Cheresh. 2003. «Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis». *Oncogene.* vol. 22, no 56, p. 9022-9029.
- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanabe, K. Yoshioka, M. Seiki et H. Sato. 2004. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration». *Cancer Res.* vol. 64, no 3, p. 1044-1049.
- Toth, M., S. Hernandez-Barrantes, P. Osenkowski, M. M. Bernardo, D. C. Gervasi, Y. Shimura, O. Meroueh, L. P. Kotra, B. G. Galvez, A. G. Arroyo, S. Mobashery et R. Fridman. 2002. «Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme». *J Biol Chem.* vol. 277, no 29, p. 26340-26350.
- Turner, C. E. 2000. «Paxillin and focal adhesion signalling». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 12, p. E231-236.
- Ueda, J., M. Kajita, N. Suenaga, K. Fujii et M. Seiki. 2003. «Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors». *Oncogene.* vol. 22, no 54, p. 8716-8722.
- Uekita, T., I. Gotoh, T. Kinoshita, Y. Itoh, H. Sato, T. Shiomi, Y. Okada et M. Seiki. 2004. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors». *J Biol Chem.* vol. 279, no 13, p. 12734-12743.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *J Cell Biol.* vol. 155, no 7, p. 1345-1356.

- van Hinsbergh, V. W., M. A. Engelse et P. H. Quax. 2006. «Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 26, no 4, p. 716-728.
- Verheul, H. M., K. Hoekman, S. Luykx-de Bakker, C. A. Eekman, C. C. Folman, H. J. Broxterman et H. M. Pinedo. 1997. «Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor». *Clin Cancer Res.* vol. 3, no 12 Pt 1, p. 2187-2190.
- Vouret-Craviari, V., C. Bourcier, E. Boulter et E. van Obberghen-Schilling. 2002. «Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells». *J Cell Sci.* vol. 115, no Pt 12, p. 2475-2484.
- Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa et E. Ruoslahti. 1996. «Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases». *Mol Cell Biol.* vol. 16, no 6, p. 2606-2613.
- Wang, F., C. D. Nobes, A. Hall et S. Spiegel. 1997. «Sphingosine 1-phosphate stimulates rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts». *Biochem J.* vol. 324 ( Pt 2), p. 481-488.
- Wang, F., J. R. Van Brocklyn, J. P. Hobson, S. Movafagh, Z. Zukowska-Grojec, S. Milstien et S. Spiegel. 1999. «Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis». *J Biol Chem.* vol. 274, no 50, p. 35343-35350.
- Webb, D. J., K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons et A. F. Horwitz. 2004. «FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly». *Nat Cell Biol.* vol. 6, no 2, p. 154-161.
- Werb, Z. 1997. «ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology». *Cell.* vol. 91, no 4, p. 439-442.
- Westermarck, J., et V. M. Kahari. 1999. «Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion». *FASEB J.* vol. 13, no 8, p. 781-792.
- Will, H., S. J. Atkinson, G. S. Butler, B. Smith et G. Murphy. 1996. «The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3». *J Biol Chem.* vol. 271, no 29, p. 17119-17123.
- Yana, I., et S. J. Weiss. 2000. «Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases». *Mol Biol Cell.* vol. 11, no 7, p. 2387-2401.

- Yatomi, Y., Y. Igarashi, L. Yang, N. Hisano, R. Qi, N. Asazuma, K. Satoh, Y. Ozaki et S. Kume. 1997. «Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum». *J Biochem (Tokyo)*. vol. 121, no 5, p. 969-973.
- Yoon, S. O., S. J. Park, C. H. Yun et A. S. Chung. 2003. «Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis». *J Biochem Mol Biol*. vol. 36, no 1, p. 128-137.
- Zamir, E., et B. Geiger. 2001. «Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions». *J Cell Sci*. vol. 114, no Pt 20, p. 3583-3590.
- Zhang, H., N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker et S. Spiegel. 1991. «Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation». *J Cell Biol*. vol. 114, no 1, p. 155-167.